

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Físico-Química y Técnicas Instrumentales



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la interacción de la aglutinina de semillas de
myrtus communis con modelos de membrana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Sainz Villanueva

DIRECTOR:

José Ramón Chantres Antoranz

Madrid, 2015

María Cristina Sainz Villanueva

TP
1983
021



x-53-228696--

**ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA AGLUTININA DE SEMILLAS DE MYRTUS
COMMUNIS CON MODELOS DE MEMBRANA**

Departamento de Físico-química y Técnicas Instrumentales

Facultad de Farmacia

Universidad Complutense de Madrid

1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

21/83

© María Cristina Sainz Villanueva

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983**

Xerox 9200 XB 480

Depósito Legal: M-1851-1983

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

ESTUDIO DE LA INTERACCION DE LA
AGLUTININA DE SEMILLAS DE MYRTUS COMMUNIS
CON MODELOS DE MEMBRANA.

Memoria presentada por
M. Cristina Sainz Villanueva
para optar al Grado de Doctor
en Farmacia

Madrid, Mayo de 1980.

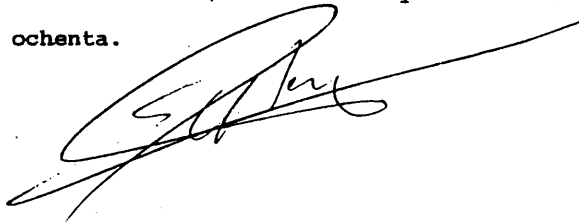
CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. 244 04 61

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
CATEDRA DE FISICO QUIMICA

DON ENRIQUE OTERO AENLLE, JEFE DEL DEPARTAMENTO
DE FISICO-QUIMICA Y TECNICAS INSTRUMENTALES DE
LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE
MADRID,

CERTIFICO: Que el presente trabajo de in
vestigación, titulado " Estudio de la interacción
de la aglutinina de semillas de *Myrtus communis* _
con modelos de membrana ", ha sido desarrollado _
en estos laboratorios, por la Licenciada en Far-
macia, M. Cristina Sainz Villanueva, bajo la di-
rección del Dr. D. J.R. Chantres Antoranz, y cons-
tituye la Tesis para aspirar al Grado de Doctor .

Para que conste firmo el presente cer-
tificado en Madrid, a doce de Mayo de mil novecien-
tos ochenta.



El presente trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Físico-Química y Técnicas Instrumentales, de la Facultad de Farmacia de la / Universidad Complutense de Madrid, durante los cursos 1.977-78, 1.978-79 y 1.979-80, bajo la dirección del _ Dr. D. José Ramón Chantres Antoranz a quien queremos _ agradecer sinceramente su excelente labor formativa y constante ayuda en el desarrollo del presente trabajo. Asimismo, al Pr. Dr. D. Enrique Otero Aenlle, Director del citado Departamento y al Pr. Dr. D. Manuel Ortega Mata, Jefe del Departamento de Técnicas Instrumentales Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Alcalá de Henares, queremos agradecer _ el estímulo y ayuda prestada en todo momento.

Igualmente, queremos expresar nuestro agradecimiento al Pr. Dr. D. Miguel Rubio, Director del Instituto Ramón y Cajal, C.S.I.C., por las facilidades / concedidas para la realización de las experiencias de Microscopía electrónica, así como por sus amables comentarios y orientaciones.

Por último, queremos dejar constancia de nuestra gratitud a todos los Profesores y compañeros del / Departamento cuyo consejo, apoyo, estímulo y desinteresada ayuda han constituido valiosos elementos en el desarrollo del trabajo.

Madrid, Mayo de 1.980

A mi hermana Ana

I N D I C E

INTRODUCCION

Generalidades sobre las lectinas	4
La fitohemaglutinina del <i>Myrtus Communis</i> : Antecedentes	21
Modelos de membrana en el estudio de la acción de las lectinas	29

PLANTEAMIENTO DE TRABAJO

45

MATERIALES Y METODOS

48

Materiales

49

Métodos experimentales

59

RESULTADOS

74

Pruebas con el extracto

75

Pruebas con liposomas

93

- Pruebas previas

94

- Efecto de la concentración de

fitohemaglutinina y de liposomas

112

"

- Influencia de cationes divalentes	120
- Microscopía electrónica	130
- Pruebas de inhibición por azúcares ...	139
- Influencia de la composición de los liposomas: Efecto del colesterol..	144
- Influencia de la carga neta superficial de los liposomas	149
- Influencia de la temperatura	155
- Estudio de la influencia del extracto sobre la transición de fase de la DPPC, a través de medidas de fluorescencia	178
Pruebas con monocapas	214
- Monocapas de PC	218
- Monocapas mixtas PC:PE	224
- Monocapas mixtas PC:Colesterol	233
- Monocapas de DPPC	240
- Monocapas mixtas PC:DCP	243
- Monocapas mixtas PC:EA	247
DISCUSION DE RESULTADOS	254
CONCLUSIONES	277
BIBLIOGRAFIA	282

INTRODUCCION

GENERALIDADES SOBRE LAS LECTINAS

El comportamiento social de la célula viva, que comprende, la comunicación intercelular, la regulación del crecimiento y de la diferenciación, la respuesta inmunológica, y quizá también la aparición de tumores malignos, está mediado, de manera esencial, por la superficie de la célula, y más concretamente, por las moléculas de azúcar ramificadas, que se encuentran en la misma. El haber reconocido recientemente estos hechos, y el que el avance en los conocimientos sobre la estructura y funciones de la superficie celular, vaya en aumento, se debe en gran parte a los estudios realizados en los últimos años, sobre las propiedades de un tipo de / proteínas llamadas lectinas.

Algunas de las moléculas lipídicas y proteicas que constituyen la membrana externa de la célula, llevan cadenas ramificadas de moléculas de azúcar (oligosacáridos), que sobresalen de la superficie celular; son glicolípidos y glicoproteínas. La idea tradicional para explicar el fenómeno, ya suficientemente establecido, de la interacción entre lectinas y células, se basa, en que poseyendo las primeras múltiples puntos de unión, al ligarse a los sacáridos de la superficie celular, ponen en conexión gran número de células, provocando su / " aglutinación " ó reagrupamiento. No obstante, numerosas observaciones y datos publicados, ponen en tela de juicio tan sencilla explicación del fenómeno. Esto, no puede sorprendernos, si por un momento, tenemos en cuenta, la disparidad que presentan tales moléculas en cuan

to a estructura, propiedades físico-químicas, y actividad biológica.

Los efectos que se observan al estudiar esta / aglutinación celular provocada por las lectinas, bajo / distintas condiciones, y variando el tipo de células así como la lectina, parecen sugerir, que han de tomarse en cuenta una serie de factores, de manera que el efecto / " puente " célula - célula, no sirve por sí solo como respuesta a las múltiples incógnitas que la investigación en este terreno, presenta día a día, y así, este proceso de aglutinación, se nos muestra como un mecanismo más complejo.

Hagamos pues, un breve repaso de la información de que disponemos hasta la fecha, acerca de las lectinas, así como de los fenómenos que desencadenan en la membrana celular.

Aspectos históricos

El estudio de este grupo de sustancias, fue iniciado por Stillmark, quien en 1888, dió la primera descripción de lo que ahora llamamos lectina, en un informe sobre el fenómeno de hemaglutinación provocado por extractos de plantas, presentado en la Universidad de Dorpat / (Estonia). Stillmark, estaba investigando, los efectos tóxicos que tienen sobre la sangre, los extractos de semillas de ricino (*Ricinus communis*), y observó, que daban lugar a una aglutinación de glóbulos rojos. Logró demostrar, que la sustancia responsable, era una proteína, a la que dió el nombre de ricina.

Poco después, H. Hellin, consiguió aislar una nueva aglutinina, de los extractos tóxicos de semillas de *Abrus precatorius*, y la denominó abrina.

Ambas aglutininas, llamaron de inmediato la atención del bacteriólogo P. Ehrlich, quien descubrió, que dichas sustancias, podían utilizarse en algunos problemas de inmunología, en lugar de la toxina diftérica, de uso corriente en aquella época.

Con la ayuda de la ricina y de la abrina, Ehrlich, pudo establecer que el fenómeno de la inmuno-especificidad, estaba relacionado con el antisuero.

En 1908, Landsteiner y Ranbitschek, afirmaron, que las lectinas poseen especificidad de especie, basados en la comparación de la actividad aglutinante de varios extractos de semillas, frente a glóbulos rojos de distintos animales. No obstante, hasta la década de los 40, se siguió manteniendo la no - especificidad de las hemaglutininas.

Los primeros experimentos, se llevaron a cabo en su mayoría, con simples extractos vegetales. La primera lectina que se logró purificar, fue la conca^{na}valina A (Con A), procedente de la judía (canavalía eu-siformis), que fue cristalizada en 1919 por J.B.Sumner. En 1936, Sumner y Howell, comprobaron que por adición / de la Con A, se provocaba la precipitación de una solución de glucógeno, y por otra parte, que el azúcar de / caña, inhibía la aglutinación de los glóbulos rojos por la Con A. W. Watkins y W. Morgan, confirmaron en 1952 la inhibición de la actividad hemaglutinante por azúcares sencillos, estableciendo en 1953 la relación existente entre los azúcares y la especificidad de grupo / sanguíneo. Al mismo tiempo, estos trabajos, suponen una de las primeras pruebas de la presencia de azúcares en las membranas celulares.

En tanto, Boyd en 1945, había descubierto la especificidad de grupo sanguíneo de las aglutininas, trabajando con el haba de Lima (grupo A específica).

Este descubrimiento, fue confirmado más adelante por / K.O. Renkonen, al encontrar en las semillas del *Lotus tetragonolobus*, una aglutinina grupo O específica. La búsqueda de una aglutinina B-específica, fue más larga, pero finalmente, I.J. Goldstein, logró aislar una de las semillas de *Bandeiraea simplicifolia*, no hace mucho tiempo.

La primera denominación que recibieron estas sustancias, fue la de hemaglutininas, y más tarde la de fitohemaglutininas, por su origen vegetal. Con el tiempo, se descubrió que también poseían capacidad de aglutinar otros tipos de células (linfocitos, fibroblastos, espermatozoos....), y que podían aislarse de algunos invertebrados como el caracol, o vertebrados como la anguila / eléctrica. Dada la necesidad de un término más amplio, y en base a sus características de selectividad, Boyd en 1954, propuso la denominación general de lectinas, para englobar a este grupo cada vez más numeroso de sustancias.

Ciertas lectinas son mitogénicas (1-4) en / cuanto que son capaces de estimular la transformación de los linfocitos en grandes células de tipo blástico, las cuales, en última instancia, sufren una mitosis. En este aspecto, las lectinas suponen una interesante aportación a los estudios de citogenética, y al avance en la comprensión de las relaciones entre la anormalidad cromosómica, y las enfermedades humanas.

El inicio de estos estudios, se sitúa en 1960, cuando P.C. Nowell (1) comprobó que la fitohemaglutinina (PHA), la lectina de la habichuela colorada, podía estimular a los linfocitos. La semejanza entre los acontecimientos que tienen lugar en el linfocito tras la estimulación por lectinas, y las reacciones de inmunidad por inducción antigénica, es la base del papel de las /

lectinas en inmunología.

La estimulación de linfocitos B por lectinas, provoca la síntesis de inmunoglobulinas, y la correspondiente de linfocitos T, convierte a estos en células destructoras de cualquiera otra extraña, de la misma forma que el rechazo de un tejido trasplantado.

Aparte su función en el estudio del mecanismo de la respuesta inmune, y en el diagnóstico de deficiencias inmunológicas, las lectinas sirven para detectar la sensibilización provocada por agentes infecciosos, y para vigilar los efectos de ciertas formas de inmunoterapia.

La estimulación de linfocitos por lectinas, constituye asimismo, una herramienta más en el examen de los procesos bioquímicos que tienen lugar en la conversión de una célula en reposo, en otra en crecimiento activo. Los experimentos demuestran que dicha estimulación, comienza con una serie de acontecimientos en la membrana celular, pero hasta la fecha, se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual se hace pasar la señal a través de la membrana. G.L. Nicolson y T.H. Ji, han obtenido indicios de la existencia de un efecto de agrupamiento de receptores en la membrana fluida, pero aún está por comprobar si tales efectos " transmembrana " son generales.

Dado que al igual que la aglutinación, la estimulación mitogénica es el resultado de la unión de la lectina a glicoproteínas o glicolípidos de la superficie celular, a través de las unidades glucídicas, estos estudios han aportado información de gran interés, acerca de la estructura y organización de los sacáridos en la membrana. Las experiencias llevadas a cabo, principalmente con la Con A y la PHA, revelan con detalle, la composición de los receptores.

Cuando se estudia la estimulación mitogénica o cualquier otra propiedad de los linfocitos, es frecuente tropezar con serias dificultades, debido a la gran / heterogeneidad de estas células; ya incluso los procedentes del mismo órgano, comprenden varias subpoblaciones que difieren entre sí, en sus propiedades y funciones biológicas. Sería, por tanto, esencial, separar los linfocitos de subpoblaciones homogéneas, para hallar la correlación: propiedades — papel biológico — mecanismos de respuesta a diversos estímulos. La falta de métodos eficaces para tal separación según su función biológica, frena el desarrollo de múltiples estudios en este campo.

Entre las propiedades de las lectinas, quizá la de mayor relevancia por su contribución a la investigación biológica, es ~~su~~ capacidad de aglutinación selectiva de células malignas. Este hallazgo, fue publicado en 1963 por C. AuB, como resultado de unos trabajos en los que observaba la respuesta de células normales y tumorales, a la incubación con diversos enzimas. De esta manera, descubrió en la lipasa del germen del trigo, la propiedad de aglutinar las células malignas, pero no / las normales; un estudio más profundo del enzima, puso de manifiesto su impurificación con una pequeña proteína, responsable de la aglutinación, y que hoy día denominamos aglutinina del germen de trigo (WHA).

Más adelante, L. Sachs y M. Inbar, hallaron la misma propiedad en la Con A. Esto significó para los científicos, la posibilidad de profundizar en las investigaciones del cáncer, ya que ésta, era una de las pocas lectinas de que se disponía comercialmente en estado puro.

Sachs, Ben-Ami Sela, H.Lis y N. Sharon, observaron que la aglutinina de soja (SBA), también podía distinguir las células normales de las malignas, y desde

entonces se ha demostrado que numerosas lectinas poseen esta actividad.

En general, las células malignas se aglutinan con concentraciones muy bajas de lectina, mientras que las normales, necesitan de una concentración de 10 a 20 veces superior.

M. Burger, comprobó, que una pequeña proporción de las células normales, sí se aglutina. Identificadas las células, observó que estaban en proceso de mitosis, y por tanto dedujo que la membrana celular normal, durante la división, se asemeja en cierta forma a la de las células transformadas.

En 1971, A.A. Moscona, demostró por primera vez, que el efecto de la Con A sobre las neuronas de la retina de embrión de pollo, dependía en gran parte de la edad del embrión. Estos y otros resultados, apuntan a la idea de una alteración drástica de las moléculas / portadoras de carbohidratos en la superficie celular, en función de su estado evolutivo, lo que según algunos - autores, constituiría un aspecto integral del programa global de diferenciación celular.

Si bien en un principio se supuso, que si las células normales no aglutinaban era porque la lectina no se unía a la membrana, ó la cantidad unida era insuficiente, las experiencias posteriores demostraron, ante el asombro general, que tales suposiciones eran falsas. Mediante lectinas marcadas con isótopos radiactivos, se puso de manifiesto que el número de moléculas / de lectina, unidas a la superficie de la célula era el mismo, tanto si estas se aglutinaban, como si no. Por / otra parte, el tratamiento de células normales con enzimas proteolíticos, las hace sensibles a la aglutinación, en la misma medida que lo son las células transformadas, aunque se demuestra que el tratamiento enzimático, no -

hace variar el número de moléculas de lectina unidas.

Se ha ensayado el uso de estas lectinas en la inhibición del crecimiento tumoral, tanto " in vitro " como " in vivo " (5), e incluso (6), se ha intentado la inmunización frente a los tumores en el ratón, / utilizando polímeros sintéticos con lectina unida.

El uso de las lectinas en el terreno bioquímico de los procesos de aislamiento y purificación, se ha extendido en la última década. Basado en las características de especificidad glucídica que presentan algunas lectinas, la nueva técnica de cromatografía de afinidad, se está desarrollando rápidamente en los últimos tiempos. Con su ayuda, se ha conseguido el aislamiento y purificación de múltiples polímeros que contienen restos glucídicos, así como la determinación de su estructura química. De la misma forma esta técnica puede utilizarse en sentido inverso, para el aislamiento de las nuevas lectinas, previo descubrimiento de su azúcar ó azúcares específicos.

Haciendo una pequeña sinopsis de las propiedades observadas en las lectinas, y las aplicaciones que de ellas han surgido, podríamos resumirlas en los siguientes puntos :

- 1.- Especificidad para los grupos sanguíneos humanos. Aplicado a la tipificación sanguínea, diagnóstico de secretores, identificación de / nuevos tipos sanguíneos, y estudios estructurales de las sustancias características de grupo.
- 2.- Unión a azúcares. Utilizado en el estudio de receptores específicos de proteínas.
- 3.- Inducción de mitosis en linfocitos. Aplicado

al estudio de la constitución cromosómica celular, y detección de anormalidades cromosómicas.

- 4.- Aglutinación de células tumorales. Utilizado en la investigación de la arquitectura de las superficies celulares, y sus cambios bajo el proceso de transformación.
- 5.- Precipitación de polisacáridos y glicoproteínas. Utilizado en el aislamiento, purificación y estudios estructurales de polímeros con restos glucídicos; asimismo, como modelo para / las reacciones antígeno-anticuerpo.

A la vista de las considerables ventajas que ofrece este grupo de sustancias y la amplitud de sus posibilidades de aplicación en las investigaciones biológicas, pudiera parecer sorprendentemente sencillo y rentable la extensión de su uso a gran número de cuestiones. Sin embargo, su aislamiento y caracterización, presenta a menudo graves dificultades, debido a la heterogeneidad de estructura química, que bajo la clasificación general de proteínas, poseen. Por otra parte, la falta de uniformidad en el comportamiento físico-químico, fruto de lo anterior, retarda su puesta a punto, especialmente, para las aplicaciones dentro de la investigación molecular.

Aislamiento y caracterización de lectinas.

Las lectinas de origen vegetal, se encuentran localizadas fundamentalmente en las semillas, las cuales, en algunos casos, como el de las Leguminosas, contienen

elevadas proporciones de estas proteínas. Como ejemplo , podemos citar el caso de la Con A que supone el 2-3 % / del total proteico de las semillas de la canavalia eusiformis (7), y el de la SBA, que representa el 1-1'5 % de las proteínas totales de la semilla de soja (Glycine max) (8).

Antiguamente, el aislamiento de estas sustancias, se realizaba por los métodos convencionales de / fraccionamiento de proteínas — cromatografía de intercambio iónico, y otros adsorbentes como hidroxil apatito — , pero en la actualidad, se utiliza con preferencia a cualquier otro método, la técnica de cromatografía de afinidad. Algunas veces, se hace uso de adsorbentes ya comercializados (Sephadex), pero en la mayoría de los casos, la preparación de la columna, conlleva serias dificultades. Con todo, la sencillez de la preparación, el alto rendimiento, y el hecho de que las condiciones / de trabajo minimicen cualquier posible degradación de la lectina, suponen interesantes ventajas a considerar en cada caso concreto.

En líneas generales, las fases de que suele / constar un proceso de aislamiento de lectinas, son las siguientes :

En primer lugar, una extracción de las semillas, mediante solución tampón de fosfatos, isotónica , en general, PBS pH = 7'0 - 7'4, a temperatura ambiente o inferiores (9, 10), y con tiempos variables de maceración. A continuación, se procede a la decantación y / centrifugación del sobrenadante. En este extracto bruto, se provoca la precipitación de las proteínas, mediante $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$; el precipitado se dializa frente a solución salina de fosfatos, ó simplemente agua desionizada, liofilizándose después, el extracto proteico que contiene la lectina, y almacenándose a muy baja temperatura /

[-20] — [-80] °C, hasta su utilización.

Cuando se trata de lectinas de procedencia animal, [11,12], los detalles concretos de la extracción, varían ligeramente, pero se siguen las mismas pautas generales.

A partir de este punto, y para la purificación, suele hacerse uso, como ya hemos mencionado, de la cromatografía de afinidad, si bien, y según queda implícito en la propia técnica, la variedad de adsorbentes y sistemas de elución, no tiene límites. Así por ejemplo, y para una misma lectina, la WGA, existen dos métodos, [13, 14] que utilizan como adsorbente ovomucoide, fijado a una matriz inerte; otros dos utilizan N - AC - Glc unida a Sepharosa [15,16], y finalmente, otro en el que la quitina pulverizada y empaquetada, sirve como matriz y ligando al mismo tiempo [17].

Como sistemas de elución, los más sencillos, consisten en soluciones, de diferente concentración, del azúcar específico de la lectina problema. Sin embargo, también es corriente el simple uso de soluciones tampón con gradiente de pH ó de fuerza iónica.

El seguimiento de la lectina en las fracciones recogidas, se realiza bien mediante test de hemaglutinación [18 - 20], bien por medida de la absorbancia a 280 nm. Para su caracterización posterior, se hace uso de la electroforesis sobre gel de poliacrilamida y el análisis de a.a.

Así, con procedimientos que siguen este esquema general, han sido aisladas : la Con A [21,22], la lectina de la lenteja (Lens esculenta) [23,24], la del guisante (Pisum sativum) [25], la de las semillas del Dolichos biflorus [26], la del caracol (Helix pomatia) [27], etc...

La obtención de fracciones homogéneas de las lectinas purificadas, presenta ciertos problemas. En pri

mer lugar, las lectinas pueden encontrarse en múltiples formas, con actividad biológica similar, y sólo ligeras diferencias en sus propiedades químicas (23-25,28-32). En segundo lugar, su comportamiento cromatográfico, así como su actividad biológica pueden verse influenciados notablemente, por la presencia ó ausencia de ciertos metales (33-36), sobre todo Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . Finalmente, el rango de pesos moleculares en que se encuentran estas proteínas, es muy amplio, desde 26.000 para la WGA (37,38), a 269.000 para la lectina del haba de Lima (32,39). Además, muchas lectinas, están compuestas de subunidades que sufren complejos procesos de asociación - disociación, dando lugar a varias formas de la misma lectina, que difieren en el tamaño molecular (40,41), y actividad. Tal es el caso de la Con A, formada de cuatro monómeros, habiéndose obtenido un peso molecular de 55.000, y otro de 100.000 (42), según / las condiciones de asilamiento.

Aspectos moleculares de la interacción lectina- membrana

Ya hemos mencionado anteriormente, algunos aspectos de la actividad biológica de las lectinas, y su potencialidad como herramientas en el estudio de la composición y comportamiento de la membrana celular. En este sentido, su utilidad, hoy en día, está enfocada hacia dos niveles dentro de la investigación: 1) su aplicación clínica, y 2) su aplicación en estudios de los acontecimientos moleculares a nivel de membrana. En este segundo punto, es en el que se hallan centrados actualmente numerosos trabajos, encaminados a dilucidar la etiología de los procesos cancerígenos. La capacidad mitogénica

de las lectinas, así como la de detención del crecimiento de células tumorales, vienen siendo utilizadas en el aislamiento de receptores de las mismas, y las variaciones de estos, en relación con la transformación celular.

En primera instancia, y demostrado que el número de moléculas de lectina ligadas, es igual en la membrana de una célula tumoral, que en la de una normal, habría que preguntarse, que es lo que induce la aglutinación en un caso, y en el otro no. Una de las explicaciones más corrientes, se basa en la posibilidad o no, de la agrupación de los receptores en el plano de la membrana. Los experimentos llevados a cabo con moléculas de lectina marcadas con ferritina, o a las que se ha ligado un colorante fluorescente, permiten detectar su situación, mediante micrografía, o simplemente el microscopio óptico. Estas experiencias ponen de manifiesto que en las células normales, la distribución de las moléculas de la lectina, es al azar, mientras que en las tumorales, aparecen agrupadas; la formación cooperativa de uniones, explicaría la diferencia de aglutinabilidad.

Ahora bien, las investigaciones también sugieren, que este agrupamiento, es inducido por la propia / lectina, y no debido a una ordenación preexistente de este tipo, de los receptores glucídicos. Estos hechos, / apuntan hacia la hipótesis de una mayor fluidez de la membrana de la célula maligna, que permitiría la difusión lateral de los receptores, a través de la bicapa lipídica. También se ha postulado, que esto explicaría la disminución del poder de adherencia de la célula, su capacidad de migración, e incluso la pérdida de la inhibición de su multiplicación, por contacto con otras células.

Partiendo de este punto, se han realizado numerosos trabajos, dirigidos a comprobar si realmente los cambios en la dinámica de la superficie celular, se ajustan

taban a tal correlación. Para ello, se ha comenzado por obtener un parámetro significativo del grado de fluidez de la membrana. Este parámetro, la microviscosidad de la región lipídica, puede estimarse mediante medida de la polarización de la fluorescencia de una sonda, localizada en dicha región. A este fin, el 1,6 difenil 1,3,5 hexatrieno (DPH), ha sido una de las más ampliamente utilizadas [43]. De esta forma, empleando linfocitos y / linfoblastos cuyo crecimiento se había estimulado por medio de la Con A [43], pudo observarse, que en las células en proliferación, el grado de polarización de la fluorescencia era inferior al de las células control; esto / supone, que la fluidez en la bicapa lipídica de la membrana de las primeras, es superior.

En experiencias similares llevadas a cabo con poblaciones normales y leucémicas de animales de experimentación [44-49], se obtienen resultados análogos.

Estas diferencias en la microviscosidad de la membrana, pueden deberse, a una deficiencia de colesterol, de cerca del 50% de la cantidad normal, en la superficie de las células del linfoma. La restauración de / los niveles normales lleva aparejada una marcada reducción en la capacidad tumoral de estas células [46].

Estos descubrimientos, han conducido a algunos autores [47] a concluir que la microviscosidad de la membrana de los leucocitos, normales ó anormales, posee un papel fundamental, en la regulación de varias funciones biológicas de tales células, "in vivo".

Sin embargo, la relación entre la fluidez de la membrana, y la movilidad de los receptores, no parece tan sencilla de demostrar. En algunos trabajos realizados utilizando linfocitos de pacientes con: leucemia linfocítica crónica, linfoma de Hodgkin, y linfoma de / Burkitt, se observa que la movilidad de los receptores

de la Con A, disminuye al aumentar la fluidez, y viceversa. Similar correlación se obtiene con fibroblastos normales y transformados (50). Esta dinámica, concuerda con la hipótesis según la cual, los receptores de la Con A se encuentran más expuestos hacia el entorno acuoso, cuando la bicapa lipídica es más rígida y viceversa (50).

Un segundo camino para llegar a explicar la movilidad de los receptores, sería a través de la denominada " hipótesis de la modulación superficial "; en ella, las glicoproteínas específicas de la superficie / celular, juegan un papel fundamental. Tales proteínas, incluidas en muchos de los receptores superficiales que ligan moléculas de procedencia externa (hormonas, antígenos...), colaboran en la mediación de funciones como la mitogénesis o la adhesión intercelular.

La localización de estos receptores glicoproteicos, con movilidad lateral en el plano de la membrana, puede esquematizarse, en general, de la siguiente forma: la molécula se encuentra atravesando la bicapa / lipídica, de manera que presenta restos proteicos hacia el citoplasma, y la parte glucídica hacia el medio exterior. En esta situación, la posición simultánea de tres partes de la molécula en fases heterogéneas (51-53), y sus potenciales interacciones con ligandos, tanto externos como internos, dificulta el análisis detallado de las fuerzas que afectan a su movimiento y distribución en el plano de la membrana. Hasta el momento, no existen estimaciones cuantitativas, de las contribuciones / relativas de las fuerzas que actúan sobre tal receptor.

No obstante, y sin excluir la posibilidad de que las interacciones a nivel de la matriz lipídica, puedan representar en ciertos casos el papel principal, parece ser que los " cross - linkage " (uniones puente

externas con otros receptores de la misma membrana) y las interacciones con componentes citoplasmáticos, son las que contribuyen fundamentalmente según este punto de vista; la bicapa fluida, ejercería, simplemente, una función permisiva (54).

En este sentido, se han llevado a cabo experiencias utilizando anticuerpos divalentes específicos, de cuyo " cross - linkage ", resultaba una difusión y agrupamiento controlado, de los receptores unidos al / anticuerpo. El proceso molecular primario, " patch formación ", refleja las propiedades de movilidad lateral de los receptores, a través de la bicapa lipídica. La fase siguiente, es la modulación superficial, de la que resulta el consecuente " capping " ó formación de núcleos de receptores.

Los detalles moleculares y cinéticos de la / mayoría de estos fenómenos de modulación, no están bien establecidos, por ello es difícil proponer una clasificación general de los mismos. Únicamente en el sistema inmunitario, los conocimientos están suficientemente avanzados, como para considerar esta hipótesis en sus detalles moleculares.

Siendo los linfocitos las células clave de este sistema, y pudiendo disponer fácilmente de ellos, como células individuales, su uso se ha generalizado en estudios de regulación de procesos en la superficie celular. Asimismo, y dado que poseen muchas propiedades fundamentales, comunes con otras células diferenciadas, la comparación de las mismas, puede resultar muy útil en una primera instancia.

En estos trabajos, el uso de lectinas mitogénicas, en el estudio del comportamiento de los receptores en la membrana del linfocito, sugiere la existencia de una modulación superficial global, y un control - /

" transmembrana ", en la movilidad y distribución de los receptores; es decir, un tipo de modulación superficial, implicada en la regulación del crecimiento. La lectina utilizada con preferencia, en estos estudios, ha sido la Con A [55-60].

A través de todo lo anteriormente expuesto, podemos apreciar, cómo el mecanismo de acción de las lectinas, no queda restringido a un efecto puente entre células, sino que por el contrario, intervienen en él otros factores físico - químicos y estructurales de la membrana plasmática, así como el estado funcional de esta. Recíprocamente, la lectina induce cambios conformacionales y funcionales en la membrana celular a la que se liga específicamente.

LA FITOHEMAGLUTININA DEL MYRTUS COMMUNIS : ANTECEDENTES

Desde hace varios años, diversos trabajos realizados en el Gabinete de Técnicas Instrumentales, de la Facultad de Farmacia de Madrid - Complutense, se han centrado en el estudio de las propiedades del extracto de semillas de *Myrtus communis*. La existencia de una / fitohemaglutinina en dichos extractos, fué inicialmente reseñada por Ortega y Dolara (61). Esta fitohemaglutinina no es específica de grupo, y solo aglutina los glóbulos rojos, cuando estos han sido lavados previamente con solución salina isotónica. .

Un estudio de la composición elemental del extracto bruto (Ortega M. y Abeger A. comunicación personal), arroja los siguientes resultados: N= 0'83%, C = 42'89%, e H = 4'38% . La baja proporción aparente de nitrógeno, contrasta con la relativamente elevada actividad hemaglutinante de estos extractos y ha inducido a pensar a la luz de otros datos, aportados por nosotros, y que más adelante reseñaremos, que la aglutinina bien pudiera tratarse de un oligopéptido más que de una proteína.

En cuanto a las características de su unión a azúcares, se ha estudiado la posible inhibición de su capacidad aglutinante de glóbulos rojos, y precipitante de componentes del suero (análisis electroforético) , con 16 azúcares (62) : celobiosa, trehalosa, D-ribosa, 2 desoxi- D -ribosa, D-arabinosa, D-galactosamina, D - glucosamina, D-galactosa, lactosa, D-fructosa, L-arabinosa, maltosa, sacarosa, D-glucosa, D-manosa y la sal-

cina. No se observó variación alguna de ambas propiedades, con ninguno de los azúcares empleados, excepto una ligera modificación en el caso de la salicina (glucósido del alcohol salicílico).

Ortega y Otero (63), han estudiado la acción " in vivo ", de los extractos de mirto, sobre un tumor experimental tipo Yoshida, encontrando que según las dosis y vías de administración de la lectina, se producía una disminución en el ritmo de crecimiento de la tumoración, en porcentaje variable desde un 27% a un 60%.

También se ha estudiado (64), la posibilidad de incorporación de la fitohemaglutinina del mirto, en la preparación de algunos tipos de inmunoadsorbentes, y su aplicación como medios útiles para las modernas / técnicas de cromatografía de afinidad.

Los ensayos sobre la capacidad de estimulación linfoblástica del extracto de *M. communis*, no dan resultados positivos (65), sin embargo, se observa un comportamiento particular de dicho extracto, ya que al aumentar su concentración en el medio, los índices de transformación respectivos, se sitúan por debajo de la unidad. Esto puede significar que su presencia está impidiendo la incorporación espontánea de timidina tritiada, a los linfocitos. Ello, podría deberse a una acción citotóxica de los componentes del extracto sobre los linfocitos. Ensayos posteriores, utilizando la Con A, demuestran de forma concluyente, que la aparente citotoxicidad del extracto, no es atribuible a la fitohemaglutinina contenida en él.

La capacidad de interacción de esta fitohemaglutinina con los componentes del suero humano, es grande (62), originándose por adición del extracto bruto, un precipitado insoluble de composición variable según el pH, pero en el que pueden considerarse incluidas, /

tanto la fracción glicoproteica, como la lipoproteica y proteica (66).

El estudio de la precipitación de las proteínas del suero humano, se llevó a cabo mediante técnicas electroforéticas, observándose que por adiciones sucesivas de extracto, precipitan las globulinas α_2 y las α_1 , produciéndose para concentraciones mayores de extracto, la precipitación casi completa de las fracciones globulínicas γ , β y α . La albúmina, pese a ser el componente proteico mayoritario, no precipita a bajas concentraciones de extracto, sin embargo a concentraciones mayores, el estudio de los proteinogramas revela un aumento de la velocidad de migración electroforética, lo que supone un cambio en la forma, carga, ó magnitud molecular de la proteína. Este hecho, unido a los resultados obtenidos por medida del índice de refracción, y la técnica colorimétrica del verde de bromocresol, específica de la albúmina, confirma la existencia de algún tipo de interacción albúmina-fitoheماغلوتينina, previa a la precipitación. Esta, puede a su vez llegar a conseguirse por eliminación en el suero del resto de los componentes proteicos con mayor afinidad por la aglutinina. Existe por / tanto, un proceso competitivo, que explica la reducida proporción de albúmina en el precipitado del suero humano.

La posibilidad de una correlación entre el peso molecular de las proteínas del suero, ó su contenido en carbohidratos, y la precipitabilidad por el extracto de mirto, han conducido a un estudio por separado, de / las mencionadas fracciones proteicas. Mediante técnicas colorimétricas e inmunoelectroforéticas (67), se ha / demostrado que no existe tal correlación.

Dentro del estudio de la capacidad precipitante del extracto de mirto, sobre los componentes del suero humano, se realizaron una serie de ensayos por inmu-

noelectroforesis, para determinar dicha capacidad sobre las inmunoglobulinas (67). De los resultados obtenidos, la afinidad por las Ig M, podría ser reflejo de una cierta selectividad de la fitohemaglutinina, por las cadenas pesadas, mientras que la diferente afinidad por las cadenas ligeras kappa y lambda, explicaría las diferencias en actividad precipitante, en un mismo tipo de inmunoglobulina como la Ig G.

El extracto bruto de mirto (pH= 5'6), en solución salina ClNa 0'9 %, precipita asimismo la hemoglobina (62). Por adición de cantidades crecientes de aquel, y siguiendo el proceso por electroforesis de los sobrenadantes, se observa la aparición de una nueva banda junto a la hemoglobina, de mayor movilidad, desplazándose la longitud de onda de máxima absorción de la REM. desde 416 a 408 nm. Este hecho, parece indicar, una posible transformación de la hemoglobina en metahe-moglobina.

La unión de la fitohemaglutinina del mirto a los hematíes fijados con glutaraldehído (sistema muy estable frente a los choques osmóticos más extremos), conduce a una modificación de la membrana del hematíe, que se demuestra por técnicas electroforéticas y de tinción. El sistema hematíes - glutaraldehído - aglutinina, conserva aunque bastante limitada, su capacidad de interacción con proteínas y lipoproteínas, lo que representa una ventaja sustancial, en cuanto que el proceso gana en selectividad.

Otro de los aspectos en que se ha ensayado la posible utilidad del extracto de mirto, es el referente a la alimentación humana. Concretamente, se ha estudiado su interacción con la caseína, y proteínas del lacto suero de la leche de vaca (68).

La fracción lipídica del suero humano, es la que presenta mayor afinidad por el extracto de mirto.

Con pequeñas concentraciones de él, precipitan casi totalmente, triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos, y colesterol libre y esterificado. Estudiando la movilidad electroforética de los sobrenadantes que resultan de la adición de cantidades crecientes de extracto de mirto al suero humano, se comprueba, por empleo de técnicas / de tinción específicas de lipoproteínas, que con las primeras adiciones de extracto, precipitan las quilomicronas, y β - lipoproteínas de alto contenido en triglicéridos. A mayor concentración de extracto también precipitan las α y pre α - lipoproteínas.

Esta capacidad del extracto de *Myrtus communis*, ha sido utilizada para la consecución de un método de / aclaramiento de sueros lipémicos (69). En efecto, el extracto simplemente, ó bien la fitohemaglutinina fijada sobre eritrocitos tratados con glutaraldehído, constituyen un sistema efectivo en la clasificación de dichos sueros, y puede ser usado en el análisis clínico , para eliminar la interferencia, debida a la turbidez, en las determinaciones espectrofotométricas.

La mayor afinidad de los extractos de mirto , por los lípidos que por el resto de los componentes del suero, apunta hacia la idea de que un mecanismo de interacción hidrofóbica, se presente como preponderante para esta fitohemaglutinina. Ello, junto a su no-inhibición por los azúcares inhibidores más comunes, entre las lectinas estudiadas, parece indicar que dicha fitohemaglutinina debiera englobarse en el grupo de lectinas / que se apartan del comportamiento típico y mecanismo de interacción, mediado por carbohidratos, más generalmente aceptado.

Por otra parte, la contribución de los mencionados mecanismos hidrofóbicos, en la hemaglutinación, ha sido puesta en evidencia, por Ochoa y cols (70) .

Utilizando la técnica de cromatografía de afinidad, en la que el adsorbente está constituido por estromas de / eritrocito tratados con glutaraldehído, ensayan la purificación de la lectina del *Phaseolus vulgaris*, variedad garbancillo, y la del *Phaseolus coccineus*, variedad alubia, con distintos sistemas de elución. El dato más sorprendente que obtienen, es la recuperación del 31 % y / 43 % respectivamente, de la actividad aglutinante aplicada, de dichas lectinas, simplemente por elución con agua destilada. Este resultado sugiere, la participación de una adsorción hidrofóbica a los estromas.

La contribución de este factor hidrofóbico en la hemaglutinación, es aplicable no solo al caso de lectinas que son débilmente inhibidas por azúcares, ó, no lo son en absoluto, sino también a aquellas inhibidas / específicamente (71,72). Por ejemplo, se ha demostrado que la Con A aglutina liposomas sin carbohidratos en su composición, y esta observación, se interpreta (74), como debida posiblemente a un efecto hidrofóbico. En esta línea, Ochoa y cols (73), han estimado la hidrofobicidad de la citada lectina, a través de experimentos en los que se variaba la temperatura, concentración salina, e hidrofobicidad del adsorbente. Los resultados, muestran una consistencia con los criterios aceptados de interacción hidrofóbica, entre biomoléculas y ligandos hidrofóbicos.

Hemos de hacer notar, que a pesar de haberse / estudiado más de un millar de extractos, de diferentes especies y variedades de plantas, solo se ha descubierto especificidad " in vitro " por carbohidratos, en un número reducido de ellos; este número, es aún menor si consideramos aquellas lectinas con especificidad de grupo sanguíneo.

Dado que el interés de los investigadores, se / ha enfocado preferentemente hacia estos dos grupos cita-

dos, los conocimientos que hoy en día se poseen en el campo de las lectinas, puede resultar, finalmente, que sean muy limitados, debido a su carácter particular.

Ochoa y cols (73), han encontrado, que el establecimiento de una escala de hidrofobicidad de las lectinas, puede revelarse de insospechada importancia . Por ejemplo, las lectinas que presentan marcada especificidad por azúcares (lectinas químio - específicas), y al tiempo son específicas de grupo (lectinas sero-específicas), son menos hidrofóbicas que las químio-específicas sin especificidad de grupo — no sero-específicas —, y estas a su vez, lo son menos que aquellas no sero - específicas y no químio - específicas. Es decir, la afinidad de las lectinas por las células, no debe restringirse exclusivamente a su capacidad de unión a carbohidratos. La posibilidad de que uniones no específicas, como interacciones hidrofóbicas, puedan participar en las primeras fases de la aglutinación debe tenerse en cuenta, a pesar de que predomine la interacción mediada por carbohidratos.

Entre las lectinas que han sido caracterizadas, no se ha descubierto ninguna característica distintiva común, excepto el hecho de ser proteínas. Muchas de ellas, contienen carbohidratos, pero otras no. Algunas poseen un 20% de cisteína, mientras que en otras, el contenido es mucho menor ó nulo.

Por otra parte, su afinidad por las células, es muy variable, pudiendo ponerse en evidencia a través del parámetro V_m : mitad de la velocidad máxima. De esta forma, puede observarse, que el proceso de unión de la Con A a los hematíes, es relativamente lento, en comparación con el correspondiente de la SBA, y en especial, con el de la aglutinina del germen de trigo (WGA), indicando, que la afinidad de las lectinas por sus recep-

tores, varía considerablemente de unas a otras (74). Estudiando la aglutinación de fibroblastos transformados , por estas tres lectinas, se deduce, que en el caso de la Con A, el 75% de los receptores, han de ser ocupados, para alcanzar su V_m , mientras que para la SBA y la WGA, solo es necesaria la ocupación del 13-17% de los suyos. En adición a estos hechos, actualmente se dispone de datos, que evidencian la existencia de diversas especies de receptores, para una misma lectina. Las variaciones en la temperatura, pH, fuerza iónica, etc... inducirían cambios conformacionales, ó estructurales, sobre la lectina y/o el receptor, en función de su composición química. En consecuencia, el efecto de dichos parámetros físicos, solo es válido para cada caso particular, y resulta imposible deducir, un comportamiento general de las lectinas.

En el futuro, sería interesante plantearse, el estudio de los fenómenos de aglutinación, con múltiples y variadas lectinas, a fin de clasificarlas por grupos , que posean ciertas similitudes, y que pudieran hacer aplicable un modelo, para los complejos fenómenos de la / aglutinación celular.

MODELOS DE MEMBRANA, EN EL ESTUDIO DE LA ACCION DE LAS
LECTINAS.

Modelos de membrana: características generales y ejemplos de su aplicación.

El estudio de la estructura y funciones de / las membranas biológicas, ha recibido un notable impulso, con el desarrollo de sistemas modelo, mediante los cuales, pueden dilucidarse algunas de sus propiedades físico - químicas, y ciertos aspectos de la relación estructura - función de las mismas.

A.- Modelo de capas monomoleculares.

La medida de ciertos parámetros, en monocapas formadas por componentes de membrana, puede aportar valiosa información, acerca del comportamiento e interacciones de aquellos, en interfaces, pudiendo establecerse correlaciones con los fenómenos que tienen lugar en las membranas biológicas. Los parámetros que fundamentalmente interesa conocer, limitándonos al caso de la interfase aire - agua, son: tensión superficial y potencial de superficie.

El uso de monocapas de lípidos en el estudio de actividades biológicas a nivel de membrana, está basado en el hecho de que la configuración de los lípidos en una interfase aire - agua, es similar a la que tienen en dicho orgánulo. En él, la mayor parte de las moléculas lipídicas, quedan organizadas formando una capa

bimolecular (75 - 77), en la que los grupos polares / lipídicos, están en contacto entre sí, y con el medio acuoso, mientras que las cadenas hidrocarbonadas, se sitúan paralelas entre sí y hacia el interior de la bicapa. La experiencia demuestra (78) que los fosfolípidos, forman espontáneamente en la interfase aire - agua, una capa monomolecular cuyas características la hacen / asimilable a una mitad de la capa lipídica bimolecular de la membrana.

La ventaja básica de este modelo, reside, en que permite estudiar los procesos de asociación de los componentes específicos de la membrana, aunque no obstante, deben tenerse en cuenta las siguientes limitaciones: 1) es posible que no todos los lípidos de membrana se encuentren ordenados en contacto lateral, según se / mencionó anteriormente; 2) a falta de la mitad complementaria de la bicapa, las proteínas y otras moléculas que se sitúan atravesando la misma, no pueden ser estudiadas con este modelo; 3) por la misma razón, tampoco pueden estudiarse las funciones que dependen de la distribución asimétrica de los componentes de la membrana.

Las películas monomoleculares, pueden presentarse en distintos estados físicos bidimensionales, que dependen principalmente, de las fuerzas de adhesión laterales entre las moléculas, y que presentan cierta semejanza, con los estados sólido, líquido y gaseoso, de la materia en tres dimensiones. Entre los factores que influyen en el estado físico, podemos diferenciar los que dependen del sustrato, y los que dependen propiamente de la composición de la monocapa; así, y siempre contando con la consabida relación entre ambos, podemos / destacar entre los primeros, el pH, la naturaleza de los electrolitos disueltos, y la temperatura. Entre los segundos, el tamaño del grupo hidrofílico, la presencia

de más de un grupo polar, el número de cadenas hidrocarbónicas, los ángulos que forman éstas entre sí, y su posible ramificación favorecen la formación de la monocapa en un estado físico concreto. Por otra parte, y con arreglo a este, pueden clasificarse en:

- Monocapas condensadas: las moléculas están empaquetadas juntas, y orientadas casi / perpendicularmente a la superficie.
- Monocapas expandidas: ocupan un área mucho mayor que las anteriores actuando como líquidos muy compresibles. Existen varios tipos según el grado de cohesión entre las moléculas.
- Monocapas en estado " gaseoso ": las moléculas están separadas, y se mueven independientemente por la superficie.

En los estudios de monocapas, existen diversas técnicas experimentales dirigidas a la determinación de parámetros que aporten la mayor información sobre / aquellas.

De las medidas de potenciales de superficie , puede deducirse, aunque no de manera absoluta, la orientación de las moléculas de la monocapa. Asimismo, se / utilizan para investigar la homogeneidad de la superficie, en virtud de las violentas fluctuaciones de potencial ante la presencia de dos fases superficiales diferentes.

Por medidas de viscosidad superficial, es posible distinguir las monocapas en estados físicos distintos.

La técnica de microscopía electrónica, se ha empleado para seguir el estado de la superficie durante la compresión y, en general, determinar el espesor de la película monomolecular.

Finalmente, la determinación de la presión superficial (π), mediante la balanza de superficies de / Langmuir - Adam, ó por el método de la placa de Wilhelmy, es, sin duda, la más ampliamente utilizada. Cuando la concentración superficial equivale a una dilución infinita, dicha presión es directamente proporcional al número de moléculas que ocupan la superficie, lo que puede expresarse como $\pi A = KT$, siendo A el área por molécula en el plano de la película. Esta sencilla relación, se ve modificada bajo diferentes condiciones experimentales tales como temperatura, fuerza iónica del sustrato, presencia en él de ligandos específicos, etc... En la práctica, la temperatura se mantiene constante, por lo que representando la presión superficial frente al / área disponible, se obtienen isothermas, de cuyo estudio pueden deducirse ciertas características de la organización molecular de la monocapa. En este sentido, son significativos los puntos en que se produce un cambio más ó menos pronunciado en la pendiente de la curva; esto puede deberse, bien a un desmoronamiento de la estructura de monocapa — presión de colapso —, bien a una transición entre fases estrechamente relacionadas, en las / que la orientación de las moléculas de lípido varía (79), no obstante persistir la organización por contacto lateral. El cambio en la compresibilidad, se atribuye a variaciones en el grado de ordenación de las cadenas hidrocarbonadas, lo cual es congruente con algunas experiencias con rayos-X (80). En ciertos casos, las transiciones que se observan en monocapas mixtas de moléculas anfipáticas, reflejan simplemente la separación de

los componentes, formando dos fases en el plano de la / película monomolecular.

Como ya hemos mencionado con anterioridad, el modelo de monocapas, puede demostrar el efecto que sobre la arquitectura del conjunto molecular, formado por los fosfolípidos constituyentes de la matriz lipídica de la membrana, tienen los cambios en la longitud de sus cadenas hidrocarbonadas, su grado de insaturación, y la naturaleza de los grupos hidrofílicos.

En cuanto a este último punto, y en el caso de la lecitina, algunos autores (81,82), han postulado diferentes conformaciones para su grupo polar, concluyéndose, finalmente (83), que la interfase polar, posee una estructura difusa, por lo que posiblemente / el agua actúe restringiendo la movilidad de aquellas porciones de la cadena hidrocarbonada próximas a la red de grupos polares. Esto, estaría de acuerdo con los estudios de RMN (84) y los datos de difracción de rayos-X (85), que sugieren una conformación más extendida para el grupo polar, a medida que aumenta el contenido en agua. En el mismo sentido, estudios de calorimetría diferencial (86,87) sobre el sistema dipamitoil lecitina-agua, demuestran la existencia de un número concreto de moléculas de agua, unidas al grupo polar, estando relacionada su pérdida con una mayor compresibilidad de la monocapa de aquel fosfolípido (88), hecho que queda reflejado en un punto de transición característico .

Respecto a la influencia de la longitud de / las cadenas, se comprueba que una reducción en la misma da lugar a monocapas más expandidas, incrementándose el área ocupada por las moléculas (89,90).

La introducción de dobles enlaces en las cadenas de ácidos grasos, reviste un interés particular. El grado de insaturación, y en especial el primer doble en

lace, hace aumentar el área por molécula (89,91,92) , debido, al igual que en el caso de reducción en la longitud de la cadena, a la disminución de las interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de fosfolípido.

Hemos de apuntar, que estos cambios en el área por molécula, pueden correlacionarse con el cambio en las propiedades de barrera de dichas moléculas. Así, se ha comprobado sobre modelos en doble capa — liposomas — que el aumento de la permeabilidad para distintos solutos, es del mismo orden que el incremento en el citado parámetro de la monocapa equivalente (91,93).

Las monocapas mixtas de importancia biológica, han sido objeto de numerosas investigaciones. La evidencia de interacción para determinadas proporciones estequiométricas de los componentes, puede obtenerse a través de las áreas moleculares parciales o estudiando el colapso de dichas monocapas. Si hay interacción, las áreas moleculares parciales de los componentes, son distintas de las correspondientes a los componentes puros, y la monocapa mixta, colapsa como un todo, a una presión generalmente superior a las de los componentes.

Otra posibilidad de interacción, consiste en la penetración de la monocapa por un componente del sustrato con actividad superficial en la misma. Este efecto puede seguirse por medida de π y de la variación del potencial de superficie (ΔV), de tal forma que un cambio apreciable en ΔV pero no de π , indica adsorción en la capa inferior de la película, mientras que la penetración, es decir interacción con la parte polar y la no polar de la monocapa, se traduce en un cambio notable de ambos parámetros.

Un grupo de compuestos presente en muchas membranas biológicas, son los esteroides, y entre ellos destaca el Colesterol, cuyo papel en tales sistemas, ha si

do objeto de numerosos trabajos. Su proporción es característica en cada tipo de membrana, y su relación con / ciertos factores como la permeabilidad, ha sido ampliamente estudiado por técnicas de capas monomoleculares. El efecto condensante que ejerce sobre monocapas expandidas de lecitinas naturales ó sintéticas (91), se considera debió principalmente a las fuerzas de van der Waals y al puente de hidrógeno que se establece por medio de su estructura planar y del grupo hidroxilo en posición 3β. Por otra parte, se ha comprobado que este / efecto se correlaciona con una disminución en las propiedades de permeabilidad de liposomas con composición equivalente (94).

Junto a estas interacciones lípido-lípido, también se han estudiado las lípido-proteína, a través de los potenciales de superficie, y midiendo la radiactividad superficial debida a la incorporación en la monocapa de la proteína marcada (95,96). No obstante, el nivel de conclusiones en estos estudios, siempre será mucho menor, dado que la situación que refleja la monocapa, dista mucho de la que corresponde a los mismos componentes en la membrana natural.

B.- Modelo de Bicapa.

La primera descripción de un sistema formado por una película delgada de lípido, entre fases acuosas, corresponde a Langmuir y Waugh en 1938. No obstante el desarrollo de una técnica para generar a partir de lípidos biológicos, bicapas planares estables adecuadas para el estudio de la permeabilidad, se debe a Mueller y cols en 1962. Estos autores indicaron la posibilidad de que dichas estructuras pudieran constituir un modelo /

sintético interesante para la investigación de las membranas biológicas.

El método comúnmente empleado para la formación de estas bicapas, sigue siendo básicamente el original de Mueller, y consiste en "pintar" con la solución de lípidos, un anillo colocado en el seno de un medio acuoso. Inicialmente, esta película delgada refleja la luz, apareciendo colores de interferencia; con el tiempo aparecen zonas negras que crecen y coalescen hasta ocupar todo el anillo. Esto se debe a que el grosor de la película (100 \AA), es pequeño comparado con la longitud de onda de la luz visible ($3.600-7.600 \text{ \AA}$), y justifica la denominación de "black film" para estos modelos.

Las propiedades de estas películas, las hacen especialmente idóneas para pruebas de permeabilidad, / bien sea a través de medidas eléctricas (97), marcaje isotópico, ó determinación del volumen de flujo. Sin embargo, su uso queda bastante limitado por el hecho de que la incorporación de otros componentes de membrana / como las proteínas, producen extraños efectos en la medida, que parecen deberse a una disrupción general, ó a la aparición de grandes defectos en la bicapa, que conducirían a una inestabilidad mecánica de la misma. Por esta razón, no es posible extrapolar los resultados obtenidos con este modelo al comportamiento de las membranas naturales.

Desgraciadamente hasta la fecha, no se ha conseguido obtener "black film" con componentes extraídos de las membranas celulares, lo que imposibilita la reconstitución de las funciones biológicas de la misma, para ser estudiada por este intermedio.

C.- Modelo de liposoma.

El descubrimiento de que los fosfolípidos dispersados en una solución acuosa, forman espontáneamente vesículas multilamelares de bicapas concéntricas, separadas por capas de medio acuoso, se debe a Bangham. Al preparar dispersiones de lecitina para microscopía electrónica, observó, que en las estructuras formadas se alteraba la forma, en respuesta a los cambios de concentración de soluto en la fase acuosa continua; además, la presencia ó ausencia de fosfolípidos cargados en el sistema, modificaba la birrefringencia de la mesofase esméctica, para una concentración dada de electrolito en solución. Continuando con estas observaciones, posteriormente se propusieron estas estructuras, como un posible modelo complementario en el estudio de biomembranas(98).

En este punto, es importante hacer notar, que si bien los fosfolípidos pueden formar otras estructuras en medio acuoso (99), dependiendo de la proporción relativa lípido : agua, la configuración preferente para la mayoría de los fosfolípidos en presencia de un exceso de agua, es la de liposoma (100). Así por ejemplo, la PE, no forma liposomas por sí sola, sino es estructuras bimoleculares abiertas (100).

En adición a lo anterior, debe tenerse en cuenta que los fosfolípidos solo forman liposomas a temperaturas superiores a su temperatura crítica (T_c) característica, es decir, cuando sus cadenas de ácido graso se encuentran en estado " fluido ". Ello supone que citando como ejemplo la DPPC, la obtención de dichas estructuras, requiere temperaturas superiores a 41°C (101).

Existen tres tipos de estructuras que pueden englobarse bajo la denominación de ensamblaje de fosfolípidos y otros lípidos, que sostienen una conformación

bimolecular, pero que por sí mismos no requieren soporte mecánico para su estabilidad. Estos tres tipos de liposomas denominados: multilamelar, microvesicular y macrovesicular, se han desarrollado más por razones experimentales que por la curiosidad de conocer, la alteración de las propiedades del modelo según el tamaño y/o la forma. La evidencia de estas estructuras liposómicas mediante microscopía electrónica, puede encontrarse en numerosos trabajos (102 - 104).

Estas vesículas " líquido-cristalinas " (liposomas), pueden formarse a partir de muchos y variados fosfolípidos, siendo la composición más habitual, lecitina de huevo, con ó sin colesterol, y con ó sin lípidos iónicos (ácido fosfatídico, DCP, estearilamina..). Asimismo, pueden obtenerse con extracto de lípidos totales de la membrana celular (105).

Tras el descubrimiento por Bangham del posteriormente denominado liposoma multilamelar, resultaba / crucial establecer que el modelo se aproximaba más a una membrana cerrada, que a una estructura de célula de /, Swann. Esto no quedó demostrado, a pesar de las evidencias aportadas por Bangham y cols (106, 107) y Papahadjopoulos y Watkins (108), hasta observarse que la Valinomicina, favorecía la difusión de K^+ sobre la de Na^+ de forma selectiva.

Uno de los mayores atractivos de este modelo es su sencillez de preparación, si bien lo que innegablemente no resulta fácil, es preparar una suspensión / de liposomas multilamelares dentro de un margen estricto de distribución de tamaños. Esto, junto con la variabilidad en el volumen acuoso que encierran, representan sus principales desventajas, especialmente en lo que a estudios de permeabilidad se refiere. La separación entre lamelas, está determinada por el balance entre las

fuerzas atractivas y repulsivas entre las mismas; respecto a las repulsivas, es probable que actúen con preferencia las interacciones electrostáticas entre los / grupos polares, y las fuerzas de hidratación de los mismos. El efecto atractivo, parece estar regido por fuerzas de van der Waals (109). La distancia de equilibrio entre bicapas y por tanto el volumen de fase acuosa dentro del liposoma, puede alterarse notablemente por factores de composición (98).

Pese a sus desventajas, un rápido repaso de / la literatura, evidencia su utilidad en una serie de estudios (110-118), si bien, actualmente el desarrollo de técnicas para la obtención de liposomas unilamelares con uniformidad de tamaño, ha desplazado considerablemente este modelo multilamelar.

Un segundo tipo de liposomas denominado " macrovesículas ", fué obtenido por Reeves y Dowben en / 1969. Su característica principal consiste en que las paredes se hallan formadas por un número pequeño de capas bimoleculares. Sin embargo por razones aún no bien conocidas, estas vesículas, que se forman en un medio / acuoso que contiene un soluto no electrolítico, no llegan a cerrarse si se sustituye este por una proteína ó un electrolito. Debido a esto, su empleo hasta el momento, ha sido muy limitado (119).

Por último, el modelo de liposoma unilamelar es el que reviste mayor interés, y ha sido profusamente utilizado por una serie de razones que enumeraremos a continuación. La obtención de estas estructuras por sonicación de dispersiones acuosas de fosfolípido, parte de los trabajos iniciales de Bangham y Saunders (120) y las evidencias aportadas por la microscopía electrónica (121). Las investigaciones dirigidas a perfeccionar el modelo, condujeron finalmente a un método (122),

en el que se combina la ultrasonificación y la filtración a través de Sepharosa 4B, para obtener una población / uniforme de vesículas. El proceso cinético que tiene lugar durante la sonicación, pudo ser estudiado mediante técnicas de RMN (123), concluyéndose que era de segundo orden.

Las dificultades técnicas que presenta la sonicación, en cuanto a la degradación oxidativa, mecánica y térmica de las moléculas de fosfolípido, han sido estudiadas por diversos autores — y serán comentadas en el capítulo de materiales y métodos —, concluyéndose, / que bajo condiciones controladas de temperatura y atmósfera inerte especialmente, no se detectan los mencionados procesos degradativos (124). Asimismo, se ha comprobado que las dispersiones de liposomas, son estables durante un periodo aproximado de una semana, siempre / que sean almacenadas a 4°C, en atmósfera inerte, y siendo el pH no inferior a 5'0 ni superior a 8'5.

Para justificar la validez de estas estructuras como modelos de membrana, se han utilizado numerosas técnicas experimentales. En primer lugar queda demostrado, que estas vesículas son estructuras de forma aproximadamente esférica, cerradas, compuestas cada una de ellas por una simple bicapa continua, y encerrando un volumen acuoso (122, 125). La caracterización de sus propiedades físicas, se ha basado en el empleo de / las técnicas más comunes para los estudios de biomembranas, y contrastando al tiempo con el modelo multilamellar.

Algunas de estas técnicas se dirigen fundamentalmente a la determinación del tamaño y forma, bajo diferentes condiciones experimentales y de composición. Entre ellas, la microscopía electrónica (126) y particularmente la técnica de criofractura (freeze-etch),

ha aportado interesantes resultados cualitativos. De / los datos de difracción de rayos-X (127), ultracentrifugación analítica (128) y dispersión de la luz (131, 132), ha podido deducirse que la fracción I obtenida por Huang (122) tras la filtración por Sepharosa 4B , corresponde a estructuras multilamelares con gran dispersión de tamaños, mientras que la fracción II está / constituida por vesículas esféricas unilamelares de tamaño más uniforme. El peso promedio es aproximadamente de $2 \cdot 10^6$ daltons, y el número, también promedio, de / moléculas de fosfolípido que integran cada una de ellas, es de 2.600. En el caso de la PC, el espesor de la bicapa resulta ser de unos 40 Å, estimándose el radio externo en (105 ± 4) Å (131).

Otra de las características de este modelo cuyo estudio reviste un interés particular, es el estado de la bicapa lipídica. La dependencia que muchos procesos biológicos presentan respecto de la mayor ó menor / " fluidez " de aquella, puede ser investigada por medio de este modelo. Las técnicas experimentales más adecuadas a este tipo de estudios son: el análisis calorimétrico diferencial (DSC), la resonancia magnética nuclear (RMN), resonancia de Spin electrónico (RSE) y fluorescencia. Mediante ellas, ha podido determinarse / el grado de empaquetamiento de la bicapa lipídica, para diferentes composiciones del liposoma y a distintas temperaturas. Ello puede correlacionarse con determinadas funciones de la membrana biológica, como la permeabilidad, interacción con agentes externos, modificaciones en procesos malignos etc...

Uno de los factores que ha sido objeto de numerosos trabajos, es la influencia del colesterol. Este se incorpora a la bicapa, en aquellas preparaciones que se realizan en su presencia (100, 138). Su efecto so-

bre el estado de fluidez de la bicapa lipídica en liposomas de diferente composición, se ha estudiado mediante RMN (132,133), RSE (134), DSC (133,135,136) y fluorescencia (137). El análisis de los resultados, refleja una buena correlación con los obtenidos mediante el modelo de monocapas. La influencia que la proporción de colesterol en las membranas naturales tiene sobre ciertas funciones de la misma como la permeabilidad, y los procesos tumorales, se ha relacionado con estudios sobre liposomas de composición equivalente (139).

Por otra parte, se han llevado a cabo gran variedad de trabajos enfocados a determinar la dependencia que, sobre la permeabilidad al agua, iones y no-electrolitos, tiene la composición del liposoma. Mientras / los liposomas de PC son permeables a los dos tipos de soluto y al agua (101, 140), la inclusión en la estructura de un lípido con carga neta (ej: E.A, P.A, DCP...) induce cambios en dicho parámetro. Así, los aniones difunden rápidamente a través de las vesículas cargadas, positiva ó negativamente (141), mientras que los cationes no pueden atravesar la bicapa existiendo una carga positiva neta en su superficie. Esta permeabilidad de / los liposomas a los iones puede ser incrementada selectivamente mediante el uso de ionóforos (142).

El empleo de estos modelos se ha extendido a los más variados aspectos de la membrana: unión de moléculas de anestésico local (143), la acción de estos / (115), los mecanismos de inflamación en la enfermedad de la gota (144), reconstitución de sistemas de transporte iónico ligados a membrana (145) e interacciones de antibióticos con membranas (146, 147).

Aplicación de los modelos de membrana en estudios del modo de acción de las lectinas .

La utilización de los modelos de membrana para dilucidar los posibles mecanismos de acción de las / lectinas, va cada día en aumento. Si bien en un principio los estudios estuvieron dirigidos preferentemente hacia las interacciones con células vivas (linfocitos, eritrocitos, células tumorales...), posteriormente el aislamiento de receptores y el mecanismo de interacción molecular lectina - receptor, se reveló de mayor trascendencia. Por esta razón, los modelos de membrana preparados a partir de los componentes totales de la membrana celular, ó bien simplemente de fosfolípidos con incorporación de algún glicolípido ó glicoproteína específico, han resultado de gran utilidad.

El modelo de monocapa y el de bicapa, no han sido empleados tan profusamente como el de liposomas; no obstante, su aplicación parece estar enfocada a la ratificación, en algunos aspectos, de los resultados obtenidos con liposomas. Puesto que la Con A, es una de las / lectinas más estudiadas, y se dispone comercialmente de ella en estado puro, los trabajos con monocapas (148) y bicapas (149) parecen haberse centrado en ella.

En el capítulo de estudios con liposomas, la bibliografía a nuestro alcance, nos demuestra la versatilidad del modelo para las experiencias más variadas y / complejas.

Combinando adecuadamente las técnicas experimentales con la composición del liposoma, y el parámetro cuali ó cuantitativo de la interacción molecular que interesa obtener, se ha conseguido esclarecer parcialmente los mecanismos de acción de diversas lectinas. Hacemos mención expresa del sentido parcial que tienen tales des

cubrimientos, ya que la posible intervención de interacciones hidrofóbicas en tales mecanismos parece presentarse actualmente como la nueva parcela de estas sustancias, que dará respuesta a muchas de las incógnitas planteadas.

A pesar de que en un principio se pensó que / las glicoproteínas constituirían los receptores específicos, en la membrana, para las lectinas, algunos trabajos empezaron a demostrar que también los glicolípidos podían ejercer tal función [150]. En la actualidad, y utilizando las más variadas lectinas, purificadas ó en extracto, las experiencias con liposomas emplean alternativamente uno u otro grupo de compuestos como receptor [71, 150-157].

Entre las técnicas empleadas, si bien la más común en todos los trabajos resulta ser la espectrofotometría en su doble aspecto turbidimétrico y absorciométrico [150, 152-155, 158], la microscopía electrónica [156-159], la RMN [151], radio-ensayos [156], la DSC [154], RSE [160], la fluorescencia [156] y la dispersión de la luz a 90° [155-157], además de otras, más específicas en cada caso, han proporcionado / ya interesantes resultados.

Los parámetros que más han atraído la atención de los investigadores en este tipo de estudios, son: la dependencia de la velocidad de reacción con la concentración de lectina y liposomas [152-154], la reversibilidad de la interacción por azúcares específicos [71, 148, 150, 153, 154, 158], la influencia de cationes divalentes [158, 159], y el estado de agregación ó fusión de los liposomas tras la adición de la lectina [156, 157, 160], aparte del aspecto principal que es la composición del liposoma.

15

PLANTEAMIENTO DE TRABAJO

"

PLANTEAMIENTO DE TRABAJO

Como se puede juzgar por lo que hemos expuesto en el capítulo de Introducción de esta memoria, existe una relación lectina - membrana plasmática, en cuanto a que este orgánulo es el lugar donde la primera / ejerce su acción.

Los trabajos que Ortega y sus colaboradores han venido realizando con extractos de semillas de *Myrtus communis*, ponen de manifiesto la presencia en aquellos de una nueva fitohemaglutinina. Los resultados obtenidos permiten encuadrar esta sustancia dentro del / grupo de lectinas que no poseen especificidad serológica ni química, ya que su acción hemaglutinante, no es específica de especie animal ni de grupo sanguíneo, y además no es inhibida "in vitro" por azúcares. Según diversos autores, estas lectinas comportan un carácter hidrofóbico notablemente superior al de las de los / otros grupos. La fitohemaglutinina del *Myrtus communis* también posee esta propiedad. Así, muestra una mayor afinidad por lípidos y lipoproteídos que por sustancias de composición glucosídica. Ello hace suponer que su acción se realice previa incorporación en la matriz lipídica de la membrana plasmática.

Partiendo de esta hipótesis, nos proponemos estudiar en el presente trabajo la interacción de esta fitohemaglutinina con modelos lipídicos de membrana, tratando de establecer la naturaleza de los efectos / que tengan lugar, y la influencia que sobre la misma presenten diversos factores, tales como: composición /

de los modelos, carga superficial de los mismos, pH, temperatura, y presencia en el medio de azúcares ó cationes divalentes; así mismo, la influencia que la aglutinina pueda ejercer sobre el comportamiento termotrópico de los fosfolípidos.

Los resultados obtenidos, se exponen en tres apartados básicos:

- Desarrollo de un método para la obtención de un nuevo extracto de mayor actividad.
- Experiencias con el modelo de liposomas.
- Experiencias con el modelo de capas monomoleculares.

El trabajo finaliza con el análisis y discusión de los resultados, y las consideraciones sobre su posible extrapolación a la membrana natural.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Lípidos

En el presente trabajo, se han utilizado dos tipos de modelo de membrana: monocapas y liposomas. La composición de dichos sistemas fué variada según los fines, y en ella entraban a formar parte: fosfolípidos (PL), colesterol y estearil amina (EA).

A) Fosfolípidos (PL): Hemos escogido como más adecuados a nuestro estudio los siguientes :
 (PC) fosfatidilcolina ó lecitina natural ;
 (DPPC) dipalmitoil fosfatidilcolina ó lecitina sintética; (PE) fosfatidil etanolamina natural; (DCP) dicetil fosfato.

a) Fosfatidilcolina (PC). La lecitina natural, fué obtenida en nuestro laboratorio a partir de yemas de huevo, de las que se / extrajo siguiendo el método descrito por Polch y cols (161). A continuación, el residuo conteniendo PC fundamentalmente y otros fosfolípidos, fué aplicado a una columna de alúmina neutra (Merck), para su purificación; la elución se llevó a cabo con: cloroformo, cloroformo: metanol (2:1; v/v) y metanol, sucesivamente, recogiendo la fracción cloroformo - metanólica en la que se /

encontraba la lecitina.

A fin de evitar en lo posible los / fenómenos de degradación oxidativa durante el proceso de purificación, todos los eluyen- tes cromatográficos contenían BHT (Sigma / Chem. Co) como antioxidante, en la propor- ción del 0'05 % del peso de la muestra apli- cada a la columna (162).

Si en los controles cromatográficos (TLC) posteriores se detectaba la presen- cia de lisolecitina junto con la lecitina, se procedía a su repurificación mediante colum- na de alúmina neutra, activada a 110°C duran- te 1h; el sistema de elución en este caso, es- taba formado por una mezcla cloroformo : me- tanol (9:1 ; v/v).

b) Dipalmitoil lecitina (DPPC).

La DL - α - dipalmitoil fosfatidil- colina ó lecitina sintética, nos fué suminis- trada por Sigma Chem. Co, en estado cristali- no, grado I, y con una riqueza del 99 % .

c) Fosfatidil Etanolamina (PE).

La L- α fosfatidil etanolamina obte- nida de yema de huevo, nos fué proporcionada por Sigma Chem. Co, en solución clorofórmica, con una riqueza del 99 % .

Estos tres fosfolípidos fueron con- trolados periódicamente para detectar posi- bles impurificaciones, así como procesos de oxidación durante su almacenamiento.

Control de pureza

La comprobación del estado de pureza de nuestros fosfolípidos, se realizó mediante la técnica de / cromatografía en capa delgada (TLC); se escogió como soporte el Silicagel H, y como eluyente se utilizaron / dos sistemas: 1) cloroformo : metanol : ácido acético : H_2O (25 : 15 : 4 : 2; v/v/v/v), y 2) cloroformo : metanol : NH_4OH 7M (46 : 18 : 3; v/v/v). El revelado / del cromatograma se llevó a cabo de la siguiente forma: con vapor de yodo, para revelar fosfolípidos con cadenas insaturadas; con mezcla de molibdato amónico y ácido perclórico (163) para detectar grupos fosfato; con reactivo de Dragendorff para detectar grupos colina; con ninhidrina para los grupos amino, y finalmente, para de terminar la materia orgánica total, se sometió a tratamiento con ácido sulfúrico al 50 % seguido de calentamiento a $110^{\circ}C$ durante 10mn.

Control de oxidación

Dada la gran susceptibilidad que presentan / los fosfolípidos a la oxidación de sus cadenas hidrocarbónicas, resulta absolutamente necesario este análisis. De lo contrario, la aparición de nuevas especies moleculares por aumento de la conjugación diénica y subsiguiente ruptura de las cadenas, alteraría las propiedades físico - químicas del fosfolípido, conduciendo a errores experimentales no controlables.

Este desarrollo degradativo, puede seguirse / a través del espectro de absorción, característico de cada compuesto, observándose un incremento en la absorbancia, en la región comprendida entre 230 - 280 nm, conforme aumenta la conjugación de dobles enlaces en las /

cadenas (164).

Para prevenir este proceso oxidativo, el almacenamiento de estos productos, se realiza en forma de soluciones clorofórmicas concentradas (164), en recipiente perfectamente cerrado, cuidando la previa creación / de atmósfera de N_2 y procurando que la temperatura sea inferior a $0^\circ C$.

d) Dicetil fosfato (DCP).

El producto con que se trabajó, fué proporcionado por Sigma Chem. Co, sin ser so-metido a posterior purificación.

Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo de todos los fosfolí-pidos, se efectuó mediante la determinación del fósforo presente. Previa digestión con ClO_4H y según el método de Bartlett (165), el complejo formado con el P_i , fué valorado frente a un standard de fósforo, por espectrofotometría U.V.

B) Colesterol: (5 - colestén - 38 - ol). Hemos utilizado producto sólido recristalizado, procedente de la casa Barcia S.A. , lote n° B- 3511; dicho producto fué sometido a control de pureza mediante cromatografía en capa delgada (TLC), siendo el soporte Silicagel H, y el eluyente: cloroformo : acetona (98 : 2, v/v). La solución madre clorofórmica, de 20 mg/ml de concentración, utilizada para la preparación de los modelos de / membrana, fué conservada en la oscuridad a $4^\circ C$ y en at-mósfera de N_2 . El control periódico de su concentra-ción, se llevó a cabo espectrofotométricamente según el método de Huang y cols (166).

C) Estearil amina (EA) : (octadecil amina) .

Se utilizó producto del grado para síntesis, proporcionado por Merck, sin posterior purificación. La solución madre, preparada en cloroformo y de concentración 5mM, fué conservada en atmósfera de N_2 y a 4°C.

Extracto de semillas de mirto

El extracto de semillas de mirto de que se disponía en un principio, y que contenía la sustancia activa (fitohemaglutinina) que nos interesa, era obtenido de la siguiente forma: una vez privados los frutos del epicarpio, y pulverizadas las semillas, se sometía dicho polvo a extracción con alcohol de 96%, a temperatura ambiente y con agitación, durante 24h. Transcurrido este tiempo, y previa centrifugación, se procedía a la evaporación del alcohol, reconstituyendo el residuo seco con solución acuosa de ClNa 0'9 %. Tras nueva centrifugación, y retirada de la capa lipídica superior, el sobrenadante era liofilizado, y conservado así el extracto a 4°C.

Dado que el extracto así obtenido, no reunía en principio las características de pureza mínima necesarias para el estudio que se iba a realizar, decidimos aplicar un método de extracción más completo. Dicho método, habría de conducirnos si no al aislamiento deseado de nuestra sustancia activa, sí al menos a la eliminación de otras sustancias acompañantes ó a su reducción a proporciones mínimas. Al mismo tiempo, y puesto que la información a nuestro alcance, nada clarificaba sobre las características de estructura química de esta fitohemaglutinina, nos sería posible conocer, como primera aproximación, ciertas características de solubilidad.

Como primer paso, se realizaron una serie de /

pruebas sencillas para la identificación de los componen
tes mayoritarios del extracto bruto liofilizado; de ellas
pudo deducirse la existencia de taninos, flavonas, y sa-
poninas. Asimismo, mediante la cromatografía sobre papel,
eluyendo con ácido acético al 60 % (v/v), revelando /
con vapores de amoníaco y observando los cromatogramas a
la luz U.V. , se detectó la existencia de cumarinas y fe-
noles de carácter ácido. La comparación de estos cromato
gramas con los de los distintos residuos que se iban ob-
teniendo en nuestro proceso extractivo, nos sirvió como
una de las directrices del mismo.

El método seguido para la obtención de un ex-
tracto " purificado ", ha consistido en la extracción con
disolventes sucesivos. En primer lugar, se procedió al /
tratamiento de las semillas pulverizadas, con metanol ;
este tratamiento se prolongó hasta comprobarse la ausen-
cia en dicho polvo, de capacidad aglutinante sobre los /
hematíes. El extracto metanólico conteniendo la fitohema-
glutina fué evaporado a sequedad, finalizando la opera-
ción en estufa de vacío a 25°C. Sobre este residuo se /
montó una extracción por Soxhlet cuyo primer eslabón fué
la eliminación de la materia grasa que el metanol hubie-
ra disuelto de las semillas. El eter de petróleo y el ci-
clo-hexano fueron los disolventes utilizados a este fin.

A continuación se procedió a la extracción so-
bre el polvo desengrasado, con : eter etílico, cloroformo,
acetato de etilo y acetona, por este orden. Las tem
peraturas utilizadas estaban condicionadas en cada caso
por el punto de ebullición y nunca fueron superiores a /
50°C. Los distintos residuos así obtenidos tras la evapo
ración de los respectivos solventes fueron desecados en
estufa de vacío a 25°C y conservados en desecador.

Durante la marcha del proceso, se fueron reali-
zando pruebas de capacidad aglutinante de los mencionados

residuos, pudiéndose comprobar que la mayor parte de / aquella se encontraba en los dos últimos , especialmente en el de acetona. La incorporación de sustancia activa por los primeros disolventes es despreciable, y por otra parte, sus residuos son pequeños y de difícil manejo.

Finalmente, y terminado el proceso, se llevó a cabo la valoración cuantitativa de los diferentes residuos, por titulación con suspensión salina de glóbulos rojos al 50 %. Para dicha valoración se realizó una extracción de una muestra de aquellos con solución acuosa de ClNa 0'9 % de forma que la relación peso residuo/volumen ClNa 0'9 % resultase igual en todos los casos. / Tras 5h en agitación, y eliminado por centrifugación el residuo insoluble, todos los sobrenadantes fueron titulados, obteniéndose los siguientes resultados:

Eter etílico	—	Título de aglutinación—	1/4
Cloroformo	—	" " "	1/8
Acetato de etilo—	"	" " "	1/64
Acetona	—	" " "	1/1.024

A la vista de estos datos, y teniendo en cuenta que los residuos de la extracción clorofórmica y con eter etílico son pequeños, así como que el correspondiente del acetato de etilo tiene aspecto siruposo y resulta muy difícil de desecar, parece que el residuo de la/ acetona sería el más adecuado a utilizar. Por otra parte de la comparación de su cromatograma con el correspondiente al extracto bruto primitivo, se confirma la eliminación total de ciertos acompañantes, y parcial de otros.

En este punto, se procedió a la extracción / con solución acuosa de ClNa 0'9 %, durante 24h. con agitación, de este polvo desecado procedente de la extracción con acetona. Tras centrifugación y titulación, los sobrenadantes fueron liofilizados en un aparato Leybold-

Heraeus mod. GT-2, conservándose en envases perfectamente cerrados y a 4°C.

Por último, y a fin de obtener un índice cuantitativo del grado de purificación conseguido respecto al extracto primitivo, llevamos a cabo una prueba de relación peso liofilizado/actividad, para ambos extractos. De esta forma, pudimos constatar que para una misma actividad aglutinante frente a los glóbulos rojos, el peso necesario del nuevo extracto liofilizado era doce veces menor; es decir, nuestro método había rendido un extracto del orden de doce veces más activo que el primitivo.

Es importante hacer notar que en el residuo final del polvo objeto de extracción por los distintos solventes, se comprobó ausencia total de actividad hemaglutinante.

Tampones

En las pruebas correspondientes a la elección del tampón más conveniente, en nuestro estudio de la interacción líposomas - fitohemaglutinina, fueron ensayados los siguientes:

- 1.- Tampón ácido acético/acetato Na, pH=5'6 obtenido a partir de las soluciones: 0'2M ácido acético, y 0'2M acetato Na.
- 2.- Tampón biftalato K/NaOH, pH=5'8, obtenido a partir de las soluciones: 0'1M biftalato K, y 0'1N NaOH.
- 3.- Tampón $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$, pH= 5'6, obtenido a /

partir de las soluciones: 1/15M $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, y 1/15M PO_4HNa_2 .

- 4.- Tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 , pH= 5'8, obtenido a partir de las soluciones: 0'1M ácido cítrico, y 0'2M PO_4HNa_2 .

Azúcares

Los distintos azúcares con que se ha trabajado en las pruebas de inhibición, son los siguientes:

- 1.- D (+) Glucosa, para fines bioquímicos(Merck)
- 2.- D (+) Galactosa, para fines bioquímicos(Merck)
- 3.- D - Manosa, para microscopía y bacteriología (Merck)
- 4.- D (+) Arabinosa, para microscopía y bacteriología (Merck)
- 5.- D - Glucosamina (Sigma Chem.Co)
- 6.- N - acetil - D - Glucosamina (2 acetamido-2-desoxi - D - glucosa), (Sigma Chem. Co)
- 7.- N - acetil - D - Galactosamina (2 acetamido - 2 - desoxi - D - galactosa), cristalino, 98% / de riqueza, grado III, (Sigma Chem. Co).
- 8.- Salicina (glucósido del alcohol o-hidroxibenílico), para microbiología, (Merck).

Otros Materiales

Sangre: La sangre utilizada para las pruebas de aglutinación, grupo O Rh +, nos fué proporcionada por el Servicio Central de Hematología del Hospital Clínico.

Sephadex: Se ha trabajado con Sephadex tipo / G-50 medio, tamaño de partícula 50-150 μ , suministrado por Pharmacia Fine Chemicals.

Quitina: (poli - N - acetil glucosamina) de caparazones de cangrejo, suministrado por Sigma Chem. Co.

Triptófano: L - Triptófano, para fines bioquímicos, suministrado por la casa Merck.

MÉTODOS

Test de actividad

La determinación de la actividad hemaglutinante de un extracto, como medida de la concentración de / fitohemaglutinina en el mismo, es el único método general actualmente utilizado. Para fitohemaglutininas purificadas, con espectro de absorción tipificado, es sencillo determinar la concentración exacta, y con ello establecer la relación concentración-actividad aglutinante.

El Test de aglutinación de diluciones seriadas del extracto, es siempre un método semicuantitativo, si bien existen algunas variaciones en la determinación del punto final, que suponen un ajuste más fino ó más / grueso del mismo. Como normas a observar para la realización del dicho test, se han tenido en cuenta las siguientes:

- 1) Utilizar solución salina isotónica (ClNa 0'9%), como medio para disolver el extracto a analizar, desechando todo resto insoluble.
- 2) Utilizar sangre reciente, del mismo día si estaba recogida simplemente sobre anticoagulante, y máximo de 15 días, si era sangre conservada para trasfundir. Se escogió para trabajar sangre grupo O Rh + .
- 3) La sangre era lavada con ClNa 0'9% tantas ve-

ces como fuera necesario, generalmente tres , hasta observar ausencia de hemolizado.

- 4) El sedimento de eritrocitos, fué diluido con solución salina isotónica, hasta obtener una suspensión del 50% con la que se trabajó habitualmente. En algunos casos, se utilizó suspensión al 2%.
- 5) Con la suspensión así preparada, se procedió a la realización del test, sobre placa, para las diluciones seriadas del extracto. El punto final fué determinado a " ojo desnudo ".

Preparación de liposomas

El modelo experimental de membrana utilizado básicamente en nuestro estudio, fué el de liposoma unilamelar. Dichas estructuras lipídicas, fueron formadas a partir de soluciones de los fosfolípidos que habían de entrar en su composición. El tratamiento subsiguiente / con ultrasonidos, condujo a la obtención de estructuras cerradas de una sola bicapa lipídica.

El procedimiento utilizado, es, básicamente , el descrito por Huang (122)

En un matraz de evaporación, se disponen los volúmenes adecuados de las soluciones clorofórmicas de los fosfolípidos, para obtener finalmente una concentración en la suspensión acuosa de liposomas, de 10 μ moles/ml. De esa cantidad, el 8% (mol/mol) corresponde a DCP, y el resto a lecitina, para la composición habitualmente utilizada. El efecto de la pequeña proporción de DCP en las vesículas, consiste en proveer a las mismas

de una carga superficial neta negativa; de esta manera, se consigue la estabilización de las suspensiones de liposomas, ya que los fenómenos de floculación se ven entorpecidos ante las repulsiones electrostáticas que se establecen.

En el caso de incorporación a los liposomas, de otro componente, tal que el colesterol, la adición / del mismo, tiene lugar en forma de solución clorofórmica, y al tiempo que los PL. La proporción de DCP, del / 8% (mol/mol), se mantiene constante respecto a la cantidad total de lípidos.

Una vez mezcladas las soluciones clorofórmicas, y previo paso de corriente de N_2 , se procede a la evaporación a vacío del cloroformo, en rotavapor, manteniéndose la temperatura del baño entre 22-24°C. La fina película de fosfolípido que queda así adherida a las paredes del matraz, es, en estas condiciones, extremadamente susceptible a la oxidación, por lo que la inmediata aplicación de corriente de N_2 , una vez restituida la presión, resulta imprescindible. Asimismo, la adición / del volumen correspondiente de solución acuosa de ClNa 0'9%, debe hacerse lo más rápido posible.

A continuación, y por medio de agitación mecánica durante 5mn, a 40°C, para conseguir la total dispersión de los lípidos, se obtiene una suspensión de liposomas de estructura multilamelar, englobando espacios acuosos entre las bicapas concéntricas.

La transformación de estas estructuras en liposomas unilamelares, se consigue mediante la acción de los ultrasonidos; nosotros, hemos utilizado un sonicador M.S.E. de sonda de titanio, de 150 W de potencia. El / tiempo de sonicación variable según la composición de las vesículas, fué de 20mn en el caso más favorable, y de 50 mn en el de mayor dificultad.

A fin de evitar procesos de degradación de tipo oxidativo durante esta operación, la dispersión fué sometida previamente al paso de una corriente de N_2 , para asegurar su saturación en atmósfera inerte.

Durante el proceso de sonicación con sonda de titanio, se desprenden pequeñas partículas de este metal, por lo que las dispersiones de liposomas obtenidas, deben ser sometidas a centrifugación seguidamente; esto, se llevó a cabo en nuestro caso, a 13.000 g y durante / 30mn. Al finalizar la operación, puede observarse un depósito de titanio en el fondo del tubo de centrifugación, que suele englobar algún aglomerado de lípido que no se encontraba formando vesículas. Tras de la centrifugación, la suspensión se deja estabilizar durante 1h, a temperatura ambiente y en atmósfera de N_2 .

Algunos autores (122,167-169) han apuntado la posibilidad de que una exposición prolongada de los fosfolípidos a la acción de los ultrasonidos, pudiera conducir, aún en presencia de N_2 , a la degradación química de aquellos, y como consecuencia, a la aparición / de productos que alterasen su comportamiento físico-químico. En este sentido, se ha llevado a cabo en nuestro laboratorio (170), un estudio del posible proceso degradativo, en nuestras condiciones operatorias. Dicho / estudio comprendía un control de pureza por cromatografía en capa delgada, y un control del estado de oxidación por medio del índice de Klein (171). Comparando los datos obtenidos para los liposomas antes y después de la sonicación, se comprueba que: 1ª) no aparece ninguna nueva especie molecular detectable por TLC; 2ª) no ha tenido lugar oxidación apreciable. Por tanto, podemos tener la seguridad, de que nuestro procedimiento, minimiza la degradación tanto oxidativa como mecánica.

La dispersión de liposomas unilamelares así /

obtenida, es casi transparente. Teniendo en cuenta que la dispersión de luz a una longitud de onda determinada es función del tamaño de la partícula en suspensión, nosotros hemos escogido este parámetro, a fin de conseguir en nuestras preparaciones una distribución similar de / tamaño. El ajuste se realizó, utilizando un espectrofotómetro U.V.- visible - I.R. próximo, Shimadzu mod. QV-50, de forma que el coeficiente de extinción " aparente " a 700nm resultara del orden de $5 \cdot 10^{-3} \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Microscopía electrónica

Las pruebas de microscopía electrónica, fueron programadas con el fin de dilucidar, si el fenómeno de interacción que tiene lugar por adición de extracto de *Myrtus communis* sobre una suspensión de liposomas, corresponde a una agregación de estas estructuras, ó a / una fusión de las mismas, tal que en el caso de la Con A. (160).

La utilización de tinción negativa, posee ventajas interesantes (120) para la visualización directa de las fases lipídicas en medio acuoso, gracias al / contraste proporcionado por la no-penetrabilidad del colorante en las primeras.

En primer lugar, la rígida fijación de la sal (fosfotungstato Na, molibdato amónico), en forma de / un cristal opaco a los electrones, parece ser protege las estructuras vesiculares. En segundo lugar, la no utilización de disolventes lipídicos, y finalmente, la posibilidad de obtener un alto grado de resolución.

En contrapartida, la técnica lleva aparejados algunos artefactos (170), por ejemplo : la tinción negativa de estromas de eritrocito, con fosfotungstato s₆.

dico ó potásico, conduce a su desintegración, mientras que usando fosfotungstato cálcico ó molibdato amónico, el reconocimiento de las estructuras es inmediato. Esto, es debido al efecto de distorsión por tensión electrostática, que producen los iones multivalentes (fosfo- / tungstato) adsorbidos. También, y por técnicas microelectroforéticas, se ha confirmado la adsorción preferente del fosfotungstato y no del molibdato.

Por estas razones, es conveniente examinar el material con varios tipos de tinción negativa, y escoger aquella con la que se obtengan las imágenes más nítidas, sin causar distorsión de estructuras.

En nuestro caso, con idea de evitar la precipitación en forma de cristales, de las sales contenidas en el medio acuoso en que habitualmente se preparaban / los liposomas, ensayamos primeramente el método utilizado por Papahadjopoulos (100). Dicho método consiste / en la utilización de una sal volátil (acetato amónico 145mM), como medio de dispersión de los liposomas, y molibdato amónico para la tinción negativa posterior.

Otro de los métodos ensayados, consistió en la preparación de los liposomas directamente en solución de molibdato amónico al 2%.

Finalmente un tercero, utilizando acetato amónico como medio de dispersión, y fosfotungstato al 2 % para la tinción.

Con estas preparaciones, pudimos comprobar, que a pesar de haber cuidado la concentración salina de las soluciones para no producir un choque osmótico en / las estructuras vesiculares, las imágenes obtenidas no resultaban válidas. Por otra parte, realizamos algunas pruebas complementarias dirigidas a comprobar si la intensidad de la interacción liposomas - fitohemaglutinina, seguido por dispersión de la luz a 90°, varía en los

medios anteriormente citados respecto a la solución tampón habitualmente utilizada. Los resultados demuestran que tanto en acetato amónico como en molibdato amónico, la interacción es notablemente más débil que en ClNa 0'9 % ó tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 , $\text{pH} = 5'45$.

A la vista de las dificultades que acabamos de mencionar, optamos por la alternativa de compaginar el método de tinción con la conservación del medio salino en que veníamos estudiando la interacción. Para ello, y siguiendo las orientaciones del Dr. M. Rubio, la muestra se depositaba en la rejilla, dejándose secar y a continuación procediéndose por lavados sucesivos a eliminar el ClNa . De esta forma, se prevenía la interferencia de los cristales precipitados en la visualización de las estructuras.

Sobre el depósito que quedaba en la rejilla tras estas operaciones, se añadió solución de fosfotungstato al 2 % para la tinción negativa, y una vez seco, se observó en un microscopio Siemens, Elmiskop 1, con potencial de aceleración de 80 KV.

La calidad de las imágenes así obtenidas, superó notablemente a las anteriores, y al tiempo, representa una ventaja en el sentido de que las imágenes de la interacción corresponden más ajustadamente al fenómeno observado por otros métodos ópticos, puesto que fue producida en las mismas condiciones.

Dispersión de la luz

La señal de dispersión Rayleigh, medida a 90° ha sido ya utilizada por diversos autores (156, 157), en estudios de interacción de lectinas con modelos de membrana. Dichos autores, han constatado la proporcionalidad

lidad entre la señal diferencial ó bien la señal relativa de dispersión a 90° , y la agregación ó fusión de las vesículas, debido a la adición de cantidades crecientes de la lectina. La señal diferencial se obtiene por sustracción de la señal debida a los liposomas, de la registrada en la interacción liposomas-lectina. La señal relativa es la señal diferencial hecha relativa al valor obtenido para los liposomas solos, en cada experiencia.

Nuestras medidas fueron realizadas en un espectrofluorímetro Perkin - Elmer mod. MPF- 44A, provisto de registro X - Y (Bausch & Lomb, Omnigraphic 2000). Las cubetas de medida eran de caras planas y 1cm de paso óptico. La temperatura fué controlada a $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ mediante el circuito de termostatización del porta cubetas, de que venía provisto el aparato, y con la ayuda / de un ultra-termostato " Colora ".

Todas las soluciones, así como las suspensiones de liposomas, fueron filtradas a través de filtros Millipore HAWG 04700 de $0.45 \mu\text{m}$ de diámetro, a fin de / asegurar la ausencia de elementos diversos en suspensión, que distorsionarían la medida. En el caso de los liposomas, se hizo necesario un análisis de fósforo (165) / posterior ya que la filtración supone al tiempo la retención de estructuras mayores y cierto grado de adsorción independiente del tamaño (173).

La longitud de onda elegida para medir la dispersión Rayleigh de la luz incidente no polarizada, fué 500 nm , siendo las aperturas de rendija las correspondientes a pasos de banda de 10 nm para la excitación y 3 nm para la emisión. El aparato se utilizó siempre en / modo " ratio " para evitar efectos debidos a fluctuaciones de intensidad de la lámpara.

En los casos en que resultó necesario, se utilizó como patrón, la señal de dispersión debida a una so

lución de PYP (P.M. 40.000) al 3% (P/V). Todos los resultados que se presentan, son media de al menos tres experiencias.

Estudios por fluorescencia

En los experimentos relativos al estudio de la influencia del extracto de *M. communis* sobre la transición de fase en liposomas de DPPC, se utilizó la técnica de fluorescencia, por considerar que era adecuada en nuestro caso para seguir el proceso.

El " anclaje " de una molécula fluorescente en la bicapa lipídica, permite seguir algunos de los fenómenos que en esta se producen, p.ej. por cambios de temperatura, a través de la medida de los parámetros de fluorescencia característicos de dicha sonda.

En nuestras pruebas, hemos utilizado a tal fin el 8 - Anilino - 1 - naftaleno sulfonato (ANS), ya que al ser altamente sensible a los cambios de polaridad en su entorno, y dado que su capacidad de unión a la bicapa depende del estado, gel ó líquido cristalino, en que se encuentra su matriz lipídica, permite fácilmente detectar la temperatura a la que tiene lugar la correspondiente transición de fase. (174)

El aparato con que se realizaron estas medidas, fué un espectrofluorímetro Perkin - Elmer mod. / MPF- 44A, con registro X - Y incorporado (Bausch & Lomb, Omnigraphic 2.000). Las cubetas de medida eran de caras planas y 1cm de paso óptico. Se interpuso un filtro de interferencia de 390 nm para eliminar el posible efecto perturbador de la dispersión Rayleigh en las medidas. Las condiciones de trabajo fijadas fueron las siguientes: longitud de onda de excitación (λ_{ex})

380 nm, apertura de rendija en la excitación, la correspondiente a un paso de banda de 10nm, y apertura de rendija en la emisión, la correspondiente a un paso de banda de 3nm. En todas las experiencias se registró el espectro de emisión efectuando las lecturas de intensidad a 475 nm. Todas nuestras medidas fueron hechas relativas a un patrón de sulfato de Quinina (5 μ g/ml) en / SO_4H_2 0'1 N.

El rango de temperaturas barrido para la prueba, fué el comprendido entre 20°C y 55°C, registrándose los espectros a intervalos de 5°C, excepto en la zona próxima a la T_c (temperatura de transición) en que el intervalo se redujo a 1°C. El barrido se llevó a cabo / en sentido ascendente de temperatura en primer lugar, y a continuación descendente. Para la termostatación se utilizó un ultra-termostato " Colora ", y para la medida de temperatura en cubeta, se hizo uso de un termómetro digital de sonda Sidevan mod. TED- 1, de sensibilidad $\pm 0'1^\circ\text{C}$. La velocidad de cambio de la temperatura osciló entre los valores de: 0'2 - 0'5°C/min.

La adición del ANS a la suspensión de liposomas, se realizó mediante inyección con microjeringa Hamilton, en la proporción de 20 μ l de solución madre de / ANS (6'6 mM), por cada 4ml de suspensión de 0'1 mg PL/ml; por tanto, la concentración final de ANS era de 33 μ M. La adición era seguida de agitación durante 15 s en agita-tubos.

Estudios de cinética

En los estudios de interacción de lectinas con modelos de membrana, uno de los primeros aspectos que / se suele abordar, es el estudio de la cinética de reac-

ción que sigue el proceso. Esto se lleva a cabo mediante medida de la turbidez (152 - 154), a tiempos crecientes de incubación de la muestra; en algunos casos (160), se utiliza la espectroscopía de RSE. De esta forma, puede estudiarse la dependencia de la velocidad inicial del proceso, con parámetros tales como: pH, temperatura, concentración de lectina, concentración de liposomas, composición del liposoma, etc...

En nuestro caso, dado que la velocidad de interacción es extraordinariamente elevada, y resultaba imposible el estudio a temperatura ambiente, nos limitamos a determinar el tiempo τ para la reacción, y a registrar las curvas de cinética a distintas concentraciones de extracto.

A tal fin, utilizamos un espectrofluorímetro Perkin - Elmer mod. MPF- 44A, siendo la señal medida, la correspondiente a la dispersión Rayleigh a 90°. Las condiciones de longitud de onda de excitación, rendijas y cubetas así como la termostatación, fueron las mismas que las utilizadas en las restantes pruebas de dispersión Rayleigh a 90°. Para los registros, se acopló un registrador Y-t, Kipp & Zonen, Micrograph BD5, siendo la amplitud de escala de 10mV, y la velocidad / de registro de 10 mm/min.

Monocapas

Las experiencias de monocapas de fosfolípidos, sencillas y mixtas, fueron realizadas como complemento de las llevadas a cabo con liposomas, y paralelas a estas en cuanto a la composición lipídica, a fin de obtener mayor información sobre las interacciones / fitohemaglutinina - fosfolípido de membrana. En estas

pruebas, la fitohemaglutinina, fué solubilizada en la subfase.

El aparato en que fueron realizadas las medidas, fué diseñado en nuestro laboratorio, siguiendo las instrucciones de los Prs. Desnuelle y Verger, y construido parcialmente en Marsella. Dicho aparato, destinado al estudio de monocapas y cinética de reacciones enzimáticas, consta de una Balanza superficial, compuesta de una cámara termostatzada, en cuyo interior se encuentra la cubeta de reacción, soportada en una bandeja; bajo esta, se localizan los mecanismos de arrastre de la barrera. En la parte superior de la cámara, se encuentra instalada una microbalanza eléctrica para la detección de las variaciones de tensión superficial en la cubeta. Adosado a este equipo, se dispone de un pH-Stat, y un registro.

La cubeta de reacción, construida en teflón, está formada por dos compartimentos: 1) el de reacción propiamente dicho, termostatzado, y que se utiliza para el estudio de cinéticas de reacción y degradaciones enzimáticas, y 2) el utilizado para los estudios de capas monomoleculares.

La barrera de compresión, dispone de cuatro velocidades. En nuestro caso, hemos trabajado con la más lenta, correspondiente a 2'6 cm/mm.

La electrobalanza acoplada, es una microbalanza Beckman LM- 600, que consta de dos partes:

- a) El sensor, en el cual se ha sustituido uno de los platillos, por un alambre del que cuelga la placa de Wilhelmy, habiéndose equilibrado su peso por colocación en el otro platillo, de pesas a modo de tara.

- b) El equipo electrónico, mediante el cual /
se ajusta la sensibilidad de la balanza .
En nuestros estudios, hemos utilizado el
rango de 100 mg por considerarlo el más _
adecuado

De la electrobalanza, pasa la señal a un pH -
Stat compuesto de dos elementos :

- a) pH- metro Metrohm, E- 512, con dos posibi-
lidades de amplitud de escala en el regis-
tro, correspondientes a 700 y 140 mV.
Nosotros hemos trabajado en la escala de
140 mV.
- b) Impulsomat Metrohm, E- 473, unido al an-
terior y conectado al motor que permite
el movimiento de la barrera.

Finalmente, y en conexión con el pH- Stat, se
dispone de un registrador (Bausch & Lomb) en el que he-
mos ajustado la velocidad del papel a 2 cm/mn para nues-
tras medidas.

El calibrado del aparato, así como los diver-
sos ajustes antes de cada experiencia, fueron realizados
según (175).

Para el cálculo de las superficies libres, to-
mamos los datos proporcionados por (175):

$$S_{TOTAL} = 472.5 \cdot 10^{16} \text{ \AA}^2$$

$$S_T = S_{Libre} + S_{Barrida} ; S_L = S_T - S_B$$

$$S_B = L \times 6 \times \frac{350 \cdot 10^{16}}{89.1} (\text{ \AA}^2)$$

siendo L la distancia en cm, sobre el eje de abscisas, desde el punto de comienzo del registro hasta el punto que nos interesa.

En cuanto a los cálculos de presión superficial, tomamos el dato, también proporcionado por (175), de la equivalencia sobre el registro:

$$1\text{mm} \rightarrow 0.241 \text{ din/cm}$$

De cada monocapa, se obtuvieron el menos dos registros; en el primero la subfase consistía en tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 , $\text{pH} = 5.45$, exclusivamente, mientras que en el segundo, se había solubilizado el extracto en dicho tampón, en concentración $1 \cdot 10^{-3}$ mg/ml. Esta concentración fue seleccionada mediante pruebas previas.

Las muestras para la siembra, fueron preparadas por toma del volumen conveniente de la solución clorofórmica madre de PL, y evaporación subsiguiente del solvente bajo corriente de N_2 , hasta sequedad. A continuación, se procedía a la reconstitución con el volumen adecuado de la mezcla éter de petróleo:etanol (80:20; v/v) y adición de una gota de alcohol amílico para favorecer la extensión de las moléculas sobre el soporte. En las soluciones así obtenidas, se calculó que la concentración quedara ajustada de tal forma que en cada toma de 50 μl para la siembra, y salvo errores de precisión, el n° de moléculas fuera idéntico.

Puesto que la mezcla éter de petróleo:etanol (80:20; v/v) es de fácil volatilización se pudo comprobar que finalizada la siembra, un tiempo de 5mn era suficiente para su eliminación; así pues, en todos los casos, se comenzó la compresión una vez transcurrido / dicho intervalo.

Para la siembra, utilizamos una microjeringa Hamilton de 50 μl , siendo este el volumen sembrado en

en todas las experiencias.

La temperatura, $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, fué mantenida /
mediante la termostatización interior de la cámara que
contiene la cubeta de reacción.

l'

RESULTADOS

"

PRUEBAS CON EL EXTRACTO

PRUEBAS CON EL EXTRACTO

Según se ha mencionado en el capítulo de mate riales y métodos, la obtención de un extracto enriquecido por sucesivas extracciones con distintos disolventes, fué precedida de una serie de pruebas, encaminadas a / determinar la viabilidad ó no de los procesos más comu nes seguidos para la purificación de lectinas.

En el presente apartado, pretendemos hacer un breve resumen de los resultados obtenidos en dichas prue bas, habida cuenta de que las mismas nos aportaron alguna información acerca de ciertos aspectos del comportamiento químico y magnitud molecular de la fitohemagluti nina del *Myrtus communis*.

Como punto de partida se realizaron algunas / pruebas cualitativas de identificación de los componentes mayoritarios, que resultaron ser fundamentalmente taninos, flavonas y saponinas. Según queda reflejado en materiales y métodos, la cromatografía sobre papel What man n° 3, eluyendo con ácido acético al 60 %, y revelando el cromatograma con vapores de amoníaco, demostró la existencia de cumarinas y fenoles de naturaleza ácida en gran cantidad.

A la vista de estos resultados , y dado que los extractos presentaban una fuerte coloración amarillo - naranja, se pensó que la misma podía ser atribuída en gran medida a las sustancias de naturaleza flavonoide. Asimismo, y puesto que dichos compuestos representarían una de las mayores contribuciones a la interferencia en el seguimiento de la fitohemaglutinina po /

por el espectro de absorción U.V., su eliminación parecía presentarse como el camino más inminente a seguir.

A tal fin, utilizamos dos tipos de adsorbentes genéricos de colorantes. En primer lugar, el carbón activado, manteniéndose una muestra de aproximadamente 25ml de extracto en contacto con 4g de C. activado, durante / 24h y con agitación intermitente. El líquido obtenido tras la subsiguiente filtración al cabo de dicho tiempo, presentaba color rojizo oscuro, que se comprobó era debido al aumento de pH en la solución, pudiendo regenerarse el amarillo primitivo por simple adición de ClH. Mediante espectro U.V. se demostró la adsorción parcial de las sustancias responsables del mismo. Finalmente por determinación del título de aglutinación del extracto en contacto con el C. activo, y comparación con un blanco del mismo extracto, se detectó la adsorción de una cantidad de fitohemaglutinina, mitad de la total contenida en el extracto, lo que se refleja en una disminución del título, desde 1/64 a 1/32.

El segundo adsorbente ensayado fué la alúmina neutra activada a 110°C 1h. Disponiendo 250mg de la misma con 4ml de extracto de título 1/8, al cabo de 5h de / contacto con agitación, no se detecta capacidad aglutinante en el líquido sobrenadante.

Como puede deducirse de los datos anteriores , la capacidad de fijación de la fitohemaglutinina es cuatro veces superior en el caso de la alúmina, que en el / del carbón activo, pero con ninguno de los dos sistemas es posible la eliminación del colorante sin arrastre simultáneo de fitohemaglutinina.

Ante la imposibilidad de la previa separación de las sustancias colorantes del extracto, procedimos directamente a ensayar la fijación de nuestra fitohemaglutinina a una matriz de Sephadex, que como ya se mencionó

en la parte teórica, se utiliza profusamente en la purificación de lectinas por cromatografía de afinidad. Para ello, se dispuso 1g de Sephadex G- 50 hinchado con solución salina de ClNa 0'9 %, con 1ml de extracto de título 1/128; se mantuvo en contacto con agitación intermitente durante 24h y a continuación se procedió a su filtración a vacío. Del análisis del filtrado se deduce una disminución de 16 veces en el título de aglutinación, una fijación grande del color a la matriz del Sephadex, y un incremento en el pH del extracto tras el contacto con dicha matriz. Aunque el Sephadex parece fijar tanto las sustancias colorantes como la responsable de la aglutinación, no existe en principio necesidad de establecer una relación entre ellas.

Comprobada la capacidad de fijación de la fitohemaglutinina al Sephadex G- 50 se intentó la separación mediante columna. La primera observación, fué la de que el color del extracto quedaba fijado en la parte superior de la columna. Por otra parte la necesidad de grandes volúmenes de elución de los eluyentes ensayados (agua, tampones, ácidos etc...), junto al hecho de no tener constancia de la existencia de otro método físico o físico-químico que resulte más específico que el test de aglutinación, hicieron fracasar el seguimiento de nuestra sustancia activa.

La idea de encontrar una matriz de fijación para la fitohemaglutinina, que nos permitiera montar una cromatografía de afinidad, nos condujo a ensayar a continuación el método propuesto por Bloch y Burger (17) para la purificación de la aglutinina del germen de trigo. Dicho método, utiliza quitina procedente de caparazón de cangrejo, lavada sucesivamente con agua, 0'05 N ClH, CO_3Na_2 al 1 % y etanol, como adsorbente.

Nosotros comprobamos que una cantidad de 250mg

de esta quitina, fija totalmente la fitohemaglutinina _ contenida en 4ml de extracto de título 1/8. Es de resal_ tar el hecho de que se produzca esta fijación, ya que el monómero correspondiente, la N-acetil glucosamina, no _ inhibe la actividad hemaglutinante de los extractos de _ mirto. No obstante, el caso no resulta sorprendente si tenemos en cuenta que la afinidad de las lectinas pare_ ce ser superior, en general, por los oligosacáridos que por los azúcares sencillos (176).

Ensayada la capacidad, de desorber la fitohe_ maglutinina, de distintos tampones y a distintos pH, nos encontramos con el mismo problema que en el caso del / Sephadex, es decir, se necesitan grandes volúmenes de _ elución. Esto nos hace pensar, que en ningún caso la de _ sorción es específica, ya que además sucesivos lavados con grandes volúmenes de agua destilada, desorben igual _ mente la fitohemaglutinina.

Un tercer medio ensayado fué el sistema glóbu _ los rojos fijados con glutaraldehído y utilizados en / suspensión al 10 %. Los resultados obtenidos en este ca _ so , tampoco parecen ser adecuados a nuestros fines.

En este punto, hemos de señalar, que en las _ pruebas de cromatografía sobre papel que acompañaron a las pruebas cualitativas previas, se realizó el recorte y subsiguiente test de aglutinación de las bandas que / aparecían. Se desarrollaron 7 cromatogramas con ácido acético al 60 %; el revelado mostró la existencia en to _ dos ellos, de 9 bandas, las cuales fueron recortadas y puestas a extraer con metanol. Tras evaporación de di_ cho solvente, el residuo seco obtenido de cada banda, _ fué reconstituido con solución salina de ClNa 0'9 % y titulado. La banda 1, más próxima al origen, presentaba un título de hemaglutinación de 1/128. La banda 2, 1/32, la banda 3, 1/16, la banda 4, 1/2 y los residuos de ex-

tracción de las bandas 5, 6, 7, 8 y 9 no presentaban capacidad hemaglutinante. Titulando el origen del cromatograma, y el espacio comprendido entre el mismo y la banda 1, se obtuvieron títulos muy elevados. Estos datos parecen indicar, que la fitohemaglutinina no se separa en bandas, ni es asociable a ninguna de las 9 obtenidas; su localización entre el origen y la mitad del cromatograma, en proporciones decrecientes, implica que más / bien se estaría produciendo una fijación a la celulosa, y una difusión a través del papel Whatman.

Ante la imposibilidad de conseguir una purificación de la fitohemaglutinina por los medios cromatográficos corrientes de purificación de lectinas, se ensayó la posibilidad de obtener un extracto enriquecido mediante eliminación por diálisis y ultrafiltración de los componentes de bajo peso molecular, sin riesgo de / dilución de las muestras como había ocurrido en casos anteriores.

Para el ensayo de diálisis, se utilizaron membranas de colodión, de tamaño de poro 8 nm^2 , lo que supone que el tamaño molecular de exclusión es el equivalente al de una proteína globular de peso molecular / 20.000. Se dispusieron tres bolsas de este tipo conteniendo un volumen de 0'5 ml de extracto, de título 1/256, a dializar frente a un volumen de 500 ml de agua destilada. El líquido de diálisis fué renovado tres veces en / 24h, reuniéndose los dializados y concentrándose hasta un volumen de 5 ml para realizar el test de aglutinación.

Tras las 24h de diálisis, se observó un incremento en el volumen contenido en las bolsas de diálisis, del orden de 5 veces el inicial.

Realizadas las oportunas correcciones para / comparar los datos, y partiendo de los resultados obte-

nidos con el test de aglutinación tras la diálisis se / comprueba : 1º) que la cantidad de fitohemaglutinina en el interior de cada bolsa de diálisis, ha disminuido 8 veces; 2º) que parte de esta, ha atravesado la membrana, ya que en el dializado se apreciaba capacidad hemaglutinante, y 3º) que una proporción considerable, y superior a la anterior, ha quedado fijada a la membrana de colodión.

La comprobación definitiva de esta última hipótesis, se llevó a cabo , colocando las bolsas de diálisis, que presentaban un color amarillo intenso, en / agua destilada. Al cabo de 48h, se apreciaba la desorción parcial del color, y la aparición de actividad aglutinante en la solución salina.

Un segundo intento de separación de los componentes de bajo peso molecular, se realizó utilizando la técnica de ultrafiltración a través de filtros Millipore (Immersible Molecular separator Kit), de membrana de Pellicon tipo PTGC, siendo el tamaño molecular de exclusión, el correspondiente a una proteína globular de peso molecular 10.000. Por la constitución química de / dicho filtro, y basados en las experiencias anteriores, presumimos que la fitohemaglutinina, quedaría, también en este caso, adherida al filtro, pero no obstante, nos interesaba comprobar si el tamaño molecular de nuestra aglutinina era inferior a 10.000 .

De la filtración del extracto por este medio, se pudo deducir, que efectivamente, la fitohemaglutinina en parte atravesaba el filtro, y asimismo quedaba en parte fijada a él. El hecho quedó ratificado con posterioridad y de manera más contundente que en el caso de la membrana de colodión, ya que la desorción de la aglutinina fijada al filtro, con solución ClNa 0'9%, implicaba en este caso, el paso a través de aquel.

La inviabilidad de las técnicas de diálisis y ultrafiltración para nuestros fines, nos llevó a un nuevo replanteamiento del problema. Dado que la proporción de sustancias flavonoides en el extracto, era, como ya / mencionamos, considerable, decidimos llevar a cabo una extracción con disolventes orgánicos, sobre el polvo de las semillas de *Myrtus communis*, a fin de poder separar dichos flavonoides de la fitohemaglutinina.

El esquema de extracción seguido, ya ha sido descrito detalladamente en el capítulo de Materiales y Métodos. Sorprendentemente, la actividad hamaglutinante, quedó concentrada precisamente en aquellos extractos más ricos en heterósidos flavónicos. Sin embargo, la actividad, por mg de extracto, obtenida, resultó ser del orden de 12 veces superior a los extractos etanólicos primitivos.

Llegados aquí, debido a nuestra carencia de / medios y de experiencia en este tipo de problemas, decidimos encomendar el aislamiento de la fitohemaglutinina, al grupo del Pr. A. González, en el Instituto de Química de Productos Naturales de La Laguna, especializado en / este tipo de trabajos.

Del conjunto de los ensayos que acabamos de describir, pueden deducirse ciertas características de la fitohemaglutinina. Así por ejemplo, los datos de las pruebas de diálisis y ultrafiltración, demuestran que se trata de una molécula de pequeño tamaño, ya que su peso molecular ha de ser inferior a 10.000. De su diferente solubilidad en los disolventes orgánicos utilizados, y de su sorprendente afinidad por matrices compuestas de polímeros glucídicos, puede apuntarse que la molécula posee características anfifílicas. En efecto, con juntando los datos de análisis elemental — vease Introducción —, los de diálisis y ultrafiltración y el hecho

de que no exista una precipitación con sulfato amónico (Ortega y cols., comunicación personal) ni con etanol ó acetona, nos abocan a postular que no se trata de una protefina. Sin embargo, bien pudiera ser un oligopéptido y esto estaría de acuerdo con el bajo contenido porcentual en N, de los extractos brutos primitivos, y los resultados de ultrafiltración.

Por otra parte, la solubilidad de la fitohema glutinina en disolventes con diferencia marcada de polaridad — ej: agua y acetona — nos hacen suponer que la molécula estaría constituida por un resto hidrofílico y otro hidrofóbico. Basándonos en el hecho de que múltiples lectinas son glicoproteínas, la solución más sencilla sería atribuir al resto hidrofílico, naturaleza glucídica, quedando la parte hidrofóbica formada por un / oligopéptido con elevada proporción de aminoácidos de cadena lateral hidrofóbica (Gli, Ala, Val, Leu, Ile, - Pro, Fen, Trip. y Met.].

Coincidiendo con la realización de las experiencias que acabamos de exponer, el descubrimiento de la capacidad de amortiguación de la fluorescencia del / Triptófano, por el extracto bruto etanólico del M. communis (Dra Abeger, comunicación personal), nos indujo a estudiar la posibilidad de un método de valoración basado en dicho efecto.

El primer punto a constatar en este estudio , fué la existencia de linealidad entre la señal de fluorescencia del Triptófano, y su concentración. Para ello, se prepararon una serie de diluciones en tampón ác. cítrico/ PO_4HNa_2 pH= 5'45, de concentración comprendida / entre 0'2 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$. Utilizando un patrón de sulfato de Quinina de 2 $\mu\text{g/ml}$ para hacer relativas las medidas, se determinó la señal de fluorescencia de la serie de muestras, excitando a 285 nm. Los resultados ob-

tenidos, fueron representados gráficamente (Fig 1).

De esta representación se deduce la existencia de linealidad para concentraciones de Triptófano inferiores a 4 µg/ml. A concentraciones superiores aparece un fenómeno de filtro interno.

La viabilidad del efecto de amortiguación de la fluorescencia del Triptófano por el extracto, como / método de valoración de la fitohemaglutinina contenida en el mismo, se fundamenta en dos puntos. En principio, es necesario determinar si el descenso de la eficacia / cuántica de las mezclas Triptófano - extracto, relativo a la del Triptófano, sigue una relación lineal con la concentración de extracto. En segundo lugar, y comprobado esto, habría que constatar que la fitohemaglutinina es realmente la única responsable de dicho efecto.

La relación entre la eficacia cuántica del / Triptófano y la de las mezclas Triptófano - extracto, viene dada por la siguiente expresión, debida a Stern - Volmer :

$$\frac{\phi_T}{\phi_{T-E}} = \frac{F_T}{F_{T-E}} \cdot \frac{(1 - e^{-2.303 A_{T-E}})}{(1 - e^{-2.303 A_T})} \quad (1)$$

donde :

ϕ_T : Eficacia cuántica del Triptófano.

ϕ_{T-E} : Eficacia cuántica de las mezclas Triptófano-Extracto.

F_T : Señal de fluorescencia de una solución de / Triptófano de concentración igual a la de este en las mezclas Triptófano - Extracto.

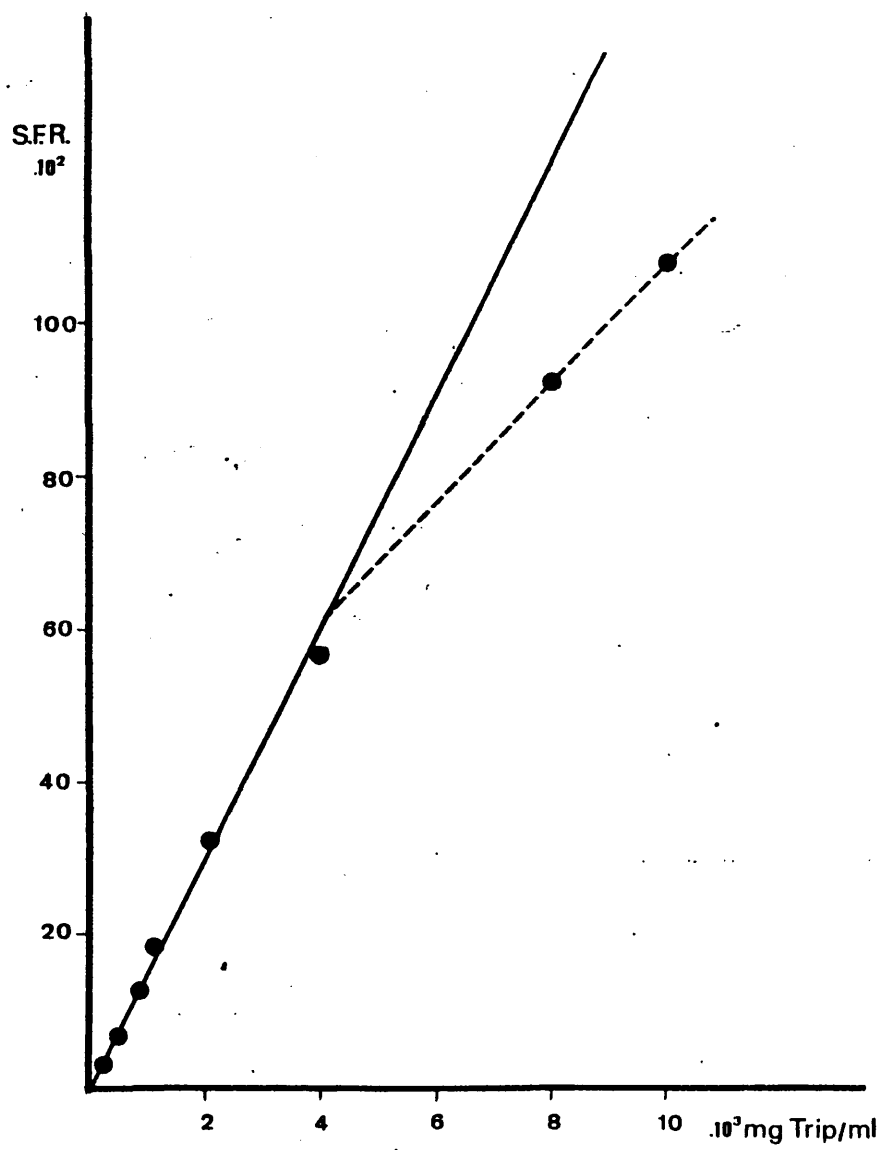


Fig. 1

F_{T-E} : Señal de fluorescencia de las mezclas Triptófano - Extracto.

A_T : Absorbancia, a la longitud de onda de excitación (285 nm), de una solución de Triptófano de concentración igual a la de este en / las mezclas Triptófano - Extracto.

A_{T-E} : Absorbancia a 285 nm, de las mezclas Triptófano - Extracto.

Seleccionada la concentración de Triptófano / de 0'5 $\mu\text{g/ml}$, como adecuada para investigar la amortiguación de la fluorescencia por el extracto purificado, pasamos a comprobar el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer, por las mezclas Triptófano - Extracto. El rango / de concentraciones de extracto barrido, fué de 1'5 $\mu\text{g/ml}$ a 16'5 $\mu\text{g/ml}$.

Previamente, se había comprobado, que tanto _ el extracto — en el rango de concentraciones mencionado (Fig 2) — , como el Triptófano (Fig 3) cumplieran también la ley de Lambert - Beer a 285 nm.

En la representación gráfica (Fig 4) puede apreciarse la estrecha concordancia de los resultados / obtenidos en dos experiencias. Asimismo, se comprueba _ que la absorbancia de las mezclas, es, en todos los casos, suma de las de los dos componentes, lo que indica ausencia de interacción química entre los estados fundamentales de ambos .

La medida de la señal de fluorescencia, a 350 nm, de estas mismas muestras, utilizando sulfato de Quinina de 2 $\mu\text{g/ml}$ como patrón, nos proporcionó los valores de F_{T-E} .

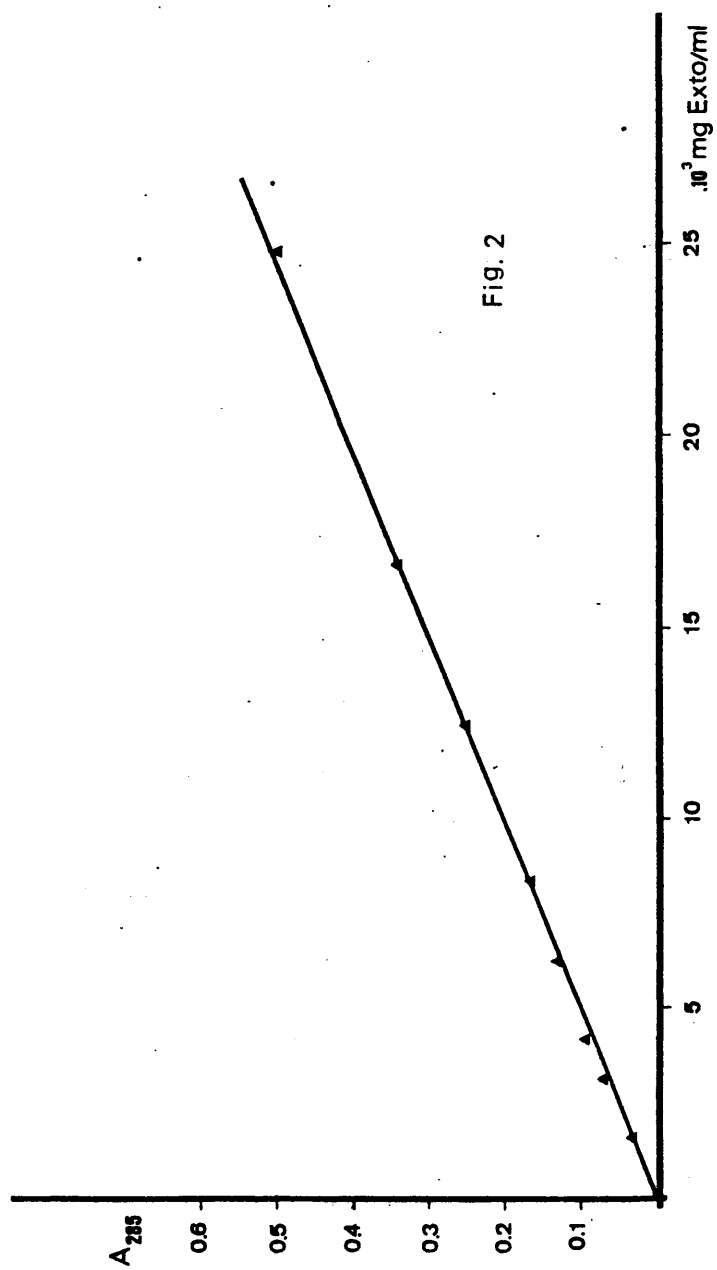


Fig. 2

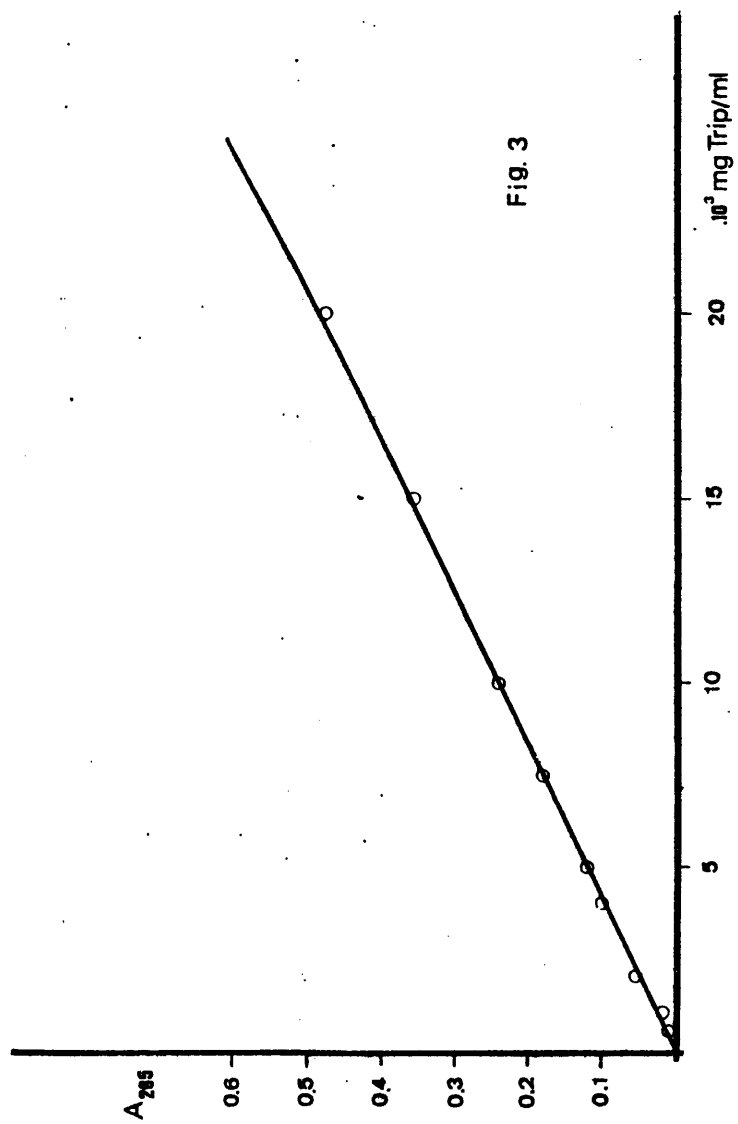
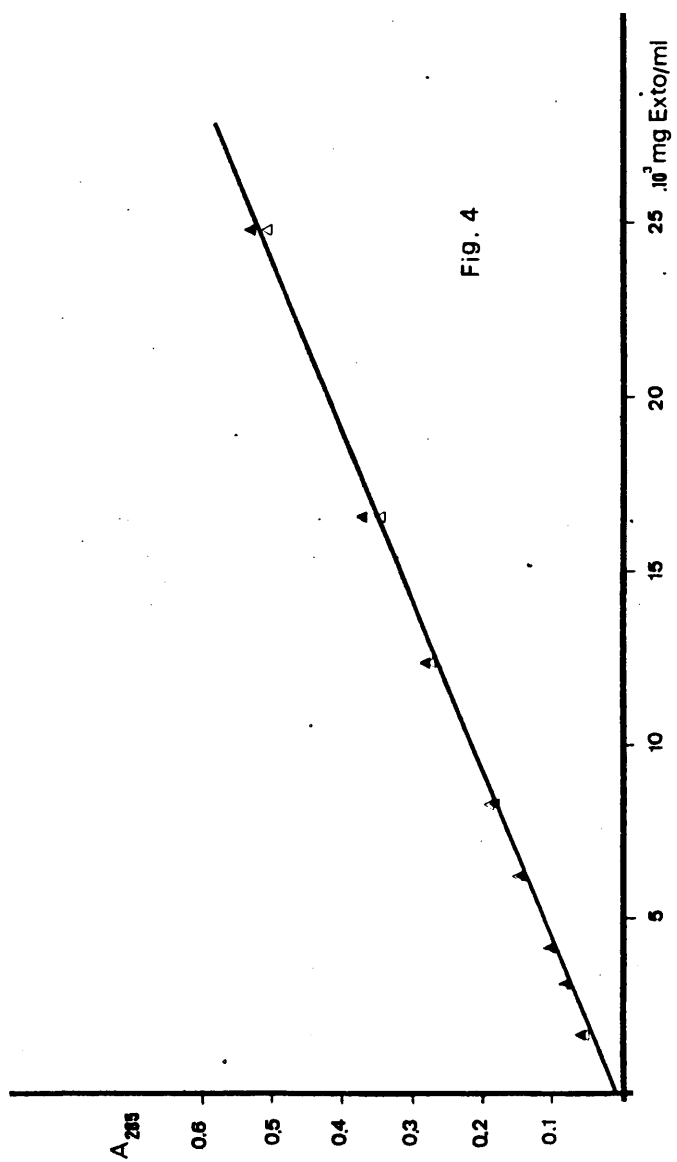


Fig. 3



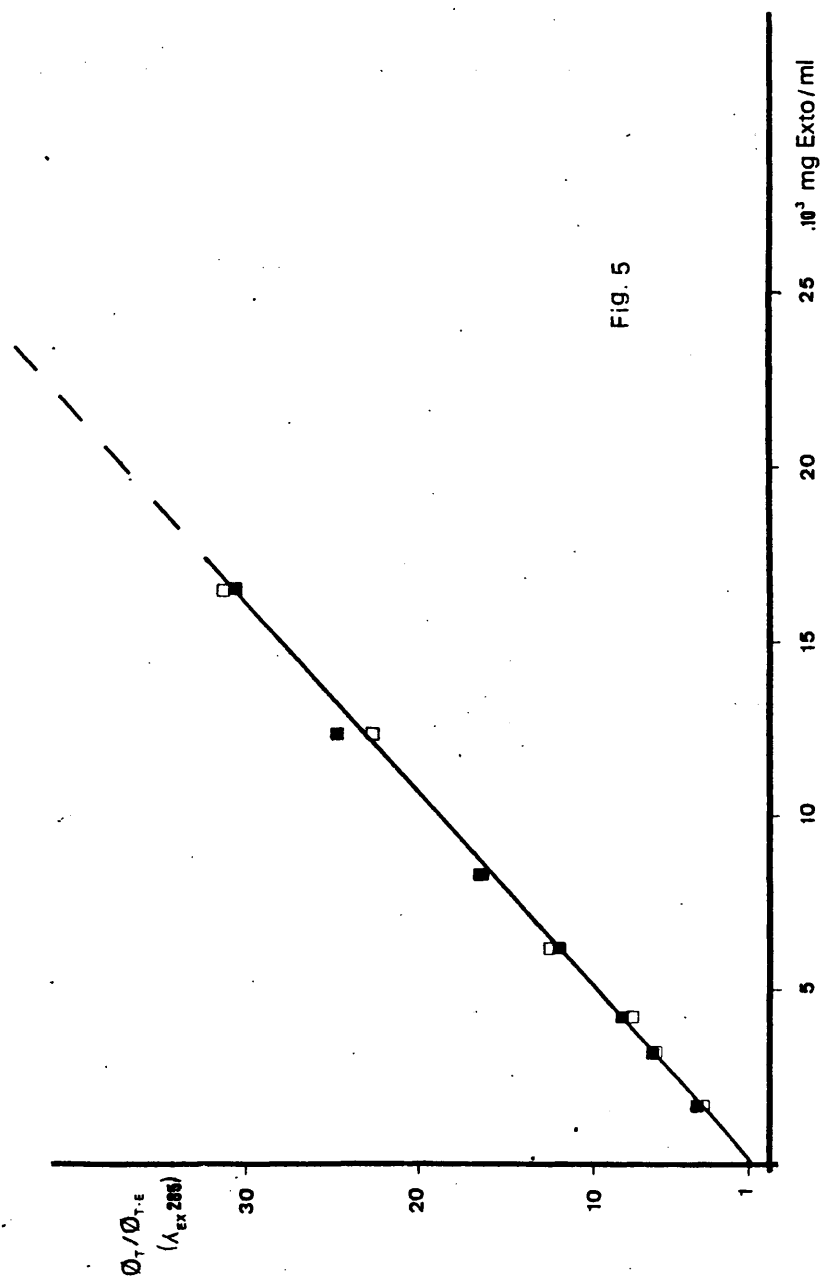
Aplicando los datos en la expresión (1), se obtuvieron los correspondientes de ϕ_T / ϕ_{T-E} , para cada concentración de extracto. La tabla (I) resume estos resultados.

Conc. Ext ^a µg/ml	ϕ_T / ϕ_{T-E} exp-1	ϕ_T / ϕ_{T-E} exp-2
1'6	3'7	3'9
3'1	6'3	6'4
4'1	8'2	7'8
6'2	12'0	12'4
8'3	16'5	16'3
12'4	24'9	22'5
16'5	31'3	30'7

T A B L A I

La representación gráfica de ϕ_T / ϕ_{T-E} frente a la concentración de extracto (Fig 5), demuestra la existencia de linealidad hasta una concentración de 16'5 µg / ml. A partir de aquí, se observaron ciertas desviaciones, posiblemente debidas a la interferencia de otros componentes del extracto. La línea discon

Fig. 5



tinua representa la extrapolación para concentraciones superiores a 16'5 $\mu\text{g/ml}$ en ausencia de interferencias. Evidentemente, esta suposición debe ser confirmada una vez que se disponga de la aglutinina pura.

En lo que respecta a la atribución a la fito hemaglutinina, de la responsabilidad de esta amortiguación de la fluorescencia del Triptófano, no se ha podido llegar a una conclusión definitiva. No obstante, se llevó a cabo un ensayo consistente en la comparación del efecto de tres extractos: el extracto primitivo / etanólico, el obtenido del residuo seco de la extracción con acetato de etilo, y el purificado con que se realizaron las pruebas anteriores, y que procedía del residuo de la extracción con acetona.

Realizadas las diluciones pertinentes para / que los tres poseyeran el mismo título de hemaglutinación, pudo observarse que sus respectivos descensos relativos de la eficacia cuántica del Triptófano, eran / sensiblemente iguales. Partiendo del supuesto de que la naturaleza y concentración de los compuestos contenidos en cada uno de ellos, no debe, en principio, ser la misma, a excepción de la fitohemaglutinina, podría correlacionarse el citado descenso con la concentración de esta. Sin embargo, dado que el test de hemaglutinación es sólo un método semicuantitativo, y que no se / puede descartar la posibilidad de existencia en los tres extractos, de una sustancia que a baja concentración fuera la responsable del efecto que nos ocupa, no podemos, de momento, hacer uso del método propuesto para / la valoración de la fitohemaglutinina del mirto. No obstante, es de esperar, que en etapas más avanzadas de su purificación, ó bien finalmente aislada la aglutinina, puedan obtenerse confirmaciones definitivas de la validez del método.

PRUEBAS CON LIPOSOMAS

PRUEBAS CON LIPOSOMAS

Pruebas previas

Nuestra contribución al estudio del modo de acción de la fitohemaglutinina del *Myrtus communis*, está basado en el empleo de modelos de membrana. Por esta razón, y partiendo del hecho constatado (69) de que esta aglutinina posee una extraordinaria afinidad por la fracción lipídica del suero humano, nuestra expectativa de interacción con liposomas de fosfolípido puro, debía ser constatada.

A este fin, se planteó una experiencia en la que, utilizando una suspensión de liposomas en solución salina de ClNa 0'9 % , de concentración 0'2 mg PL/ml, se observaba el aumento de turbidez producido al añadir un volumen igual del extracto etanólico primitivo de título de hemaglutinación 1/32, diluido 50 veces. Este método , es el seguido habitualmente por otros autores (152-157), para determinar la existencia de interacción de una lectina con liposomas de diferente composición.

En nuestro caso, el aumento de turbidez fué seguido por medida de la dispersión Rayleigh a 90°, siendo la longitud de onda de excitación, de 500 nm. De esta manera pudo observarse que la adición de la cantidad mencionada de extracto producía un incremento de señal sobre la registrada para la suspensión de liposomas blanco, / del orden de 10 veces.

Este hecho es atribuible al establecimiento de

una interacción entre el extracto y los liposomas, que habría conducido a la agregación ó fusión de tales estructuras.

La participación en este efecto de la fitohemaglutinina contenida en el extracto de mirto, no pudo ser investigada simultaneamente en esta experiencia. La razón estriba en las limitaciones impuestas por el test de hemaglutinación, respecto a las concentraciones detectables de dicha sustancia. Al no disponer de otro / método más específico y sensible, nos vimos obligados a realizar una nueva experiencia con concentración superior de extracto, y en consecuencia, de liposomas. En esta ocasión, pudo apreciarse a simple vista, que fruto de la agregación ó fusión de los modelos de membrana, el aumento de turbidez era prácticamente instantáneo, y al cabo de unos minutos, las estructuras formadas, floculaban. La centrifugación posterior de esta muestra y el análisis de la capacidad de hemaglutinación del sobrenadante, demostró que esta había desaparecido por completo.

Teniendo en cuenta que para una concentración final de extracto de título 1/8, se había utilizado / una concentración final de liposomas en la muestra, de 5 μ moles/ml, se realizaron a continuación dos experiencias más en las que manteniendo constante la concentración de extracto, se rebajaba la de liposomas a 2 μ moles/ml y 1 μ mol/ml. El resultado, fué la aparición de actividad hemaglutinante en los líquidos sobrenadantes — título 1/2 y 1/4 respectivamente — .

Estos datos reflejan que la fitohemaglutinina está implicada de una forma fundamental en la interacción del extracto, con este sistema lipídico puro.

Por otra parte, en un ensayo posterior, pudo observarse mediante técnicas espectrofotométricas y de

dispersión de la luz a 90° , que no existe signo aparente de interacción cuando las mismas proporciones anteriores de fosfolípido y extracto, se encuentran en medio metanólico. Estas observaciones nos han conducido a pensar que la interacción sea de naturaleza hidrofóbica, ó bien, y sin excluir esta posibilidad, que se requiera / la estructuración concreta del fosfolípido en forma de bicapa.

A pesar de que queda demostrado el papel fundamental que la fitohemaglutinina juega en la interacción objeto de nuestro estudio, las pruebas anteriores no son concluyentes de que dicha sustancia es la única responsable. A fin de conseguir evidencias más consistentes sobre este aspecto, se planteó una experiencia cuyo objeto era la comparación del efecto, seguido por dispersión de la luz a 90° , de tres extractos distintos, sobre la misma concentración de liposomas.

El primero de los extractos, era el etanólico primitivo, utilizado en las pruebas que acabamos de describir. Los otros dos, procedían de la extracción con / igual volumen de ClNa 0'9 %, sobre el mismo peso de residuo seco de la acetona, y el acetato de etilo (vease Materiales y Métodos, extracción sucesiva por disolventes orgánicos). Acto seguido, se procedió a su titulación para realizar las diluciones convenientes en cada caso, que permitieron obtener tres soluciones madre de título 1/32. De ellas se tomó el volumen apropiado de / forma que adicionado a la suspensión de liposomas, la concentración final de estos fuera de 0'1 mg Pl/ml y la de aquellos, la equivalente a un título de 1/32 diluida 100 veces.

Las señales registradas de dispersión de la / luz a 90° ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$), medidas en unidades arbitrarias, fueron transformadas en señal relativa, siguiendo

el criterio de Redwood y cols (156, 157), de la siguiente forma:

$$\frac{\Delta S}{S_0} = \frac{(S_I - S_E) - (S_L - S_T)}{(S_L - S_T)} \quad (2)$$

S_T = señal debida al tampón en unidades arbitrarias.
En algunos casos, corresponde al ClNa 0'9 % .

S_E = señal debida al extracto en unidades arbitrarias.

S_L = señal debida a la suspensión de liposomas blanco, en unidades arbitrarias.

S_I = señal debida a la interacción liposomas-extracto, en unidades arbitrarias.

El tiempo de incubación de las muestras, a / 25°C, fué de 30mn.

Los resultados obtenidos para los tres extractos, quedan reflejados en la tabla (II), en la que asimismo se especifica la dilución que hubo de sufrir cada uno de ellos, para obtener el correspondiente extracto madre de título 1/32.

Los datos son, como puede observarse, muy similares. La posibilidad de coexistencia de otra sustancia distinta de la fitohemaglutinina, en los tres extractos, no debe ser despreciada. No obstante, el análisis de las diferentes diluciones que han sufrido cada uno de ellos, nos obliga a rechazar la idea de que dicho hipotético compuesto, se encontrara a la misma / concentración, ó muy próxima en los tres casos. Esta

sería la única explicación de que un grado de fusión ó agregación de los liposomas dentro del estrecho margen que reflejan los resultados, fuera producido por otra de las sustancias del extracto, y no la fitohemaglutinina.

Procedencia	(Dilución)	$\Delta S/S_0$
Exto Acetona	(1/1.600)	9'2
Exto Etanólico bruto	(1/1.600)	10'1
Exto Acetato de etilo	(1/200)	10'8

T A B L A II

En consecuencia, la responsabilidad principal de la interacción liposomas-extracto de mirto, recae sobre la fitohemaglutinina, siendo, de existir, — francamente despreciables los efectos coadyuvantes de otras sustancias. Las pequeñas diferencias que pueden apreciarse en los datos aportados, son probablemente / atribuibles al error que comporta el test de aglutinación, como medida de la concentración de fitohemaglutinina.

Una vez establecidas las bases fundamentales para el inicio de nuestro trabajo, y decidido que éste había de llevarse a cabo utilizando el extracto purificado, procedente de la extracción con acetona, pasamos a cuantificar definitivamente la concentración de fito

hemaglutinina. A este fin, una cantidad de aproximadamente 5 g del polvo, residuo de la extracción con el / citado disolvente, se mantuvo en contacto con ClNa 0'9% durante 24h y en agitación intermitente. Tras centrifugación y titulación del sobrenadante, se distribuyó este en envases de 2ml para su liofilización. De estos envases de liofilizado, conservados a 4°C, se tomó una muestra de 10, y previa pesada, se reconstituyó cada / uno con 2 ml de agua destilada. Después de comprobar que el liofilizado se disolvía completamente, se reunieron las soluciones y se procedió a su titulación. Por diferencia entre el peso del envase lleno y vacío, pudo deducirse el peso de liofilizado en cada frasco, y teniendo en cuenta que en cada uno de ellos existe una cantidad muy aproximada de 18 mg de ClNa, pudo obtenerse la concentración real en mg Exto/ml de la solución titulada. Esta, que presentaba un título de 1/128, fue diluida para obtenerse una segunda de título 1/32. La concentración en peso/volumen correspondiente a esta / última, constituye el índice de equivalencia: concentración (P/V) - título, que nosotros hemos establecido para nuestro estudio.

Peso total de liofilizado	(10 muestras)	= 279'2 mg
Peso aproximado de ClNa en	(" ")	= 180'0 mg
Peso real de extracto en	(" ")	= 99'2 mg

Este peso real de extracto, estaba contenido en 20 ml de solución, por tanto, la concentración es de 4'96 mg/ml. Teniendo en cuenta un factor de dilución de 4, la concentración correspondiente a la solución / de título 1/32, es de 1'24 mg/ml.

Con posterioridad, se llevó a cabo un nuevo muestreo, pudiendo comprobarse que si bien no existe /

en los envases una homogeneidad absoluta en peso de / liofilizado, el margen de variación es estrecho, y diluidos cuatro veces tras su reconstitución, todos presentaban un título de 1/32.

A partir de este momento, se trabajó con soluciones madre de concentración 1'24 mg/ml, preparadas a partir de cada envase de liofilizado. Periodicamente, se realizó un control para determinar si se había producido pérdida de actividad hemaglutinante durante el almacenamiento.

Efecto del pH

En el estudio de una interacción como la que nos ocupa, es interesante trabajar en un medio tamponado, a fin de que el factor pH, con sus posibles consecuencias, no representen una nueva variable a tener en consideración cuando se investigue un efecto concreto.

La elección del tampón, se llevó a cabo mediante medida de la dispersión de la luz a 90°, teniendo en cuenta los efectos sobre la interacción y sus / componentes por referencia al medio salino de ClNa - , 0'9% .

Escogimos para ello, cuatro tampones de pH = 5'8 + 0'2 : ác. acético/acetato Na, biftalato/NaOH, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HNa}_2$ y ác. cítrico/ PO_4HNa_2 . Dado que la preparación madre de liposomas (92 % PC + 8 % DCP) , se hallaba en ClNa 0'9 % , dichos tampones fueron hechos / isotónicos con este medio, para evitar la lisis de nuestros modelos, ó simplemente la variación de su tamaño como consecuencia de su comportamiento osmótico.

Se comprobó en primer lugar que la capacidad de estos tampones no se veía rebasada cuando la concentración de extracto en ellos era de 12'4 µg/ml. Esta ,

era según acabamos de explicar, la que corresponde a / una de título 1/32 diluida 100 veces, es decir, con la que se había venido trabajando en pruebas anteriores. Mantuvimos esta concentración como idónea, hasta realizar el estudio del grado de interacción frente a la / concentración de extracto.

Igualmente, la capacidad tampón, tampoco se veía rebasada al producirse la interacción con líposomas de concentración final 0'1 mg/ml.

Realizadas estas comprobaciones básicas, pasamos a la medida de la señal de dispersión de la luz a 90°, cuyos resultados quedan resumidos en la tabla / (III).

A simple vista puede observarse, que en lo _ que respecta a los líposomas, ni se promueve agregación ó fusión de los mismos, ni se altera sensiblemente su tamaño promedio por efecto de la composición del tampón.

No ocurre así con el extracto, en el que ciertos tampones parecen provocar agregaciones ó interacciones entre sus componentes por comparación con el medio salino de ClNa. No obstante, tanto si la fitohemaglutinina se ve involucrada en esto como si no, ello _ no interfiere su capacidad de interacción con los líposomas, ya que las señales debidas a la interacción pueden considerarse muy aproximadamente iguales.

Esto explica las diferencias existentes de _ unos tampones a otros, en la señal diferencial (ΔS), y en la relativa ($\Delta S/S_0$).

El único tampón que no parece afectar a las sustancias del extracto, es el de ác.cítrico/ PO_4HNa_2 - (McIlvaine), siendo su comportamiento en este aspecto, y a través de estas medidas, muy similar al de la / solución salina de ClNa 0'9 %.

Influencia de la composición del tampón sobre la interacción.

Tampón	$S_L - S_T$	$S_E - S_T$	ΔS	$\Delta S/S_0$
Ac. Acético/Acetato Na	2'6	3'9	23'9	9'2
Biftalato/NaOH	2'3	3'2	24'6	10'7
$PO_4 H_2 K / PO_4 HNa_2$	2'4	4'7	21'4	8'9
Ac. cítrico/ $PO_4 HNa_2$	2'6	0'1	29'9	11'5
ClNa 0'9 %	2'6	0'1	27'3	10'5

pH = 5'8 \pm 0'2

T A B L A I I I

Por esta razón, hemos escogido dicho tampón para nuestro estudio, siendo además de resaltar que el rango de pH que con él se puede abarcar— de 2'5 a 8'0 — nos facilita en gran medida la investigación subsiguiente del efecto del pH sobre la interacción liposomas - fitohemaglutinina.

El efecto del pH sobre la capacidad aglutinante de células por lectinas, ha sido extensamente estudiado. Mäkelä (1.957) utilizando glóbulos rojos tratados con glutaraldehído, y barriendo el rango de pH / comprendido entre 4'5 y 11'0, encontró que para la mayoría de las aglutininas, el grado de agregación era / aparentemente igual dentro de este amplio límite, y solo ligeramente más débil en los pH extremos. El título de aglutinación de las lectinas es prácticamente consistente en este rango de pH, lo cual sugiere que la aglutinación tiene lugar aún bajo condiciones en las que / ambas, célula y molécula de lectina, poseen carga neta del mismo signo. Las moléculas de lectina pueden ser desprendidas de la membrana celular a pH inferior a 3 (177), lo que nuevamente refleja un paralelismo con la estabilidad de los complejos antígeno - anticuerpo.

En general, aquellas lectinas cuya capacidad aglutinante es dependiente de la presencia de cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) en el medio, son muy sensibles a variaciones de pH. Así, en el caso de la Con A, a pH / bajo, los iones metálicos son expulsados de la estructura molecular, y la lectina pierde con ello su actividad (40). A pH= 7'0, la molécula de Con A está protegida frente a la proteólisis por el Ni^{2+} , pero a pH superior a 8'0, este efecto protector desaparece (178). Asimismo, el estado de agregación de la lectina es pH-dependiente: mientras a pH= 6'0 la Con A es un dímero fundamentalmente, a pH neutro adopta estructura de te-

trámetero (40, 41).

En nuestras experiencias, y como ya hemos mencionado, se utilizó tampón ác.cítrico/ PO_4HNa_2 (McIlvaine), barriendo en intervalos de 0'2 unidades el rango de pH entre 2'4 y 8'0. Todos ellos fueron llevados a isotonicidad con ClNa de acuerdo con las tablas tomadas de Elving y cols (179).

Partiendo de la preparación de liposomas(92% PC + 8% DCP) en medio salino de ClNa 0'9%, se realizaron las diluciones pertinentes para obtener una concentración final a cada pH, de 0'1 mg PL/ml. De la misma / forma, la concentración final del extracto en cada medio, fué de 12'4 $\mu\text{g/ml}$.

Producidas las interacciones, y tras un tiempo de incubación de 30mn a 25°C, se procedió a la medida de la señal de dispersión de la luz a 90° ($\lambda_{\text{ex}}=590\text{nm}$). Al igual que en ensayos anteriores, para cada muestra / de interacción, se dispusieron los correspondientes blancos de liposomas y de extracto.

Los resultados fueron elaborados, en la forma usual para obtener los datos de señal relativa ($\Delta S/S_0$). La razón de utilizar este parámetro, y no ΔS para la / comparación de los resultados, estriba en la necesidad de corregir el pequeño defecto introducido, al proceder los liposomas de preparaciones diferentes.

La medida de la dispersión de la luz a 90° demuestra la estabilidad de nuestros modelos de membrana frente al pH, dentro de nuestros límites. Este hecho / concuerda con los trabajos de Huang (124), a los que ya hemos hecho referencia en la parte teórica, y según los cuales, queda probada la estabilidad de los liposomas durante una semana, siempre que el pH no sea superior a 8'5 ni inferior a 5'0.

Por su parte, las señales debidas al extracto,

parecen indicar, que tampoco en él se producen variaciones con el pH del medio.

Finalmente, y en lo que respecta a las interacciones, los resultados quedan reflejados en la Fig - (6). Como puede apreciarse, no existe un máximo de interacción para un pH definido, sino que por el contrario aparece una plataforma entre $\text{pH} = 3'0$ y $\text{pH} = 6'5$, descendiendo la intensidad de interacción a partir de estos límites.

Nuevamente, hemos de hacer notar, que este resultado es concordante con las observaciones de Mäkelä (1.957) sobre la aglutinación de glóbulos rojos tratados con glutaraldehído, por diversas lectinas. Paralelo a este comportamiento, y de acuerdo con la información que ya hemos apuntado, sería de esperar que la actividad de nuestra fitohemaglutinina no dependiera de la presencia de iones metálicos en el medio.

La explicación del descenso de actividad hacia los límites de pH es compleja y requiere las siguientes consideraciones. El pH, en cuanto a la modificación que supone de las cargas en la superficie celular, determina la magnitud de la barrera energética entre las células. A pH inferiores a 3'0, la carga negativa se ha reducido considerablemente, y ha aumentado la positiva — la PC es zwitterion entre $\text{pH} = 3'5 - 10$, y DCP tiene un $\text{pK}_a \approx 3'9$ — . Lo contrario ocurre a pH superior a 7'0. En uno y otro caso, la consecuencia es un aumento en la carga neta superficial con el consiguiente incremento en la barrera energética que se opone al contacto entre los liposomas. Al mismo tiempo no se puede excluir la posibilidad de que en alguno de los límites, se altere la propia molécula de fitohemaglutinina, variando con ello su actividad.

Redwood y cols (1967), obtienen una dependen

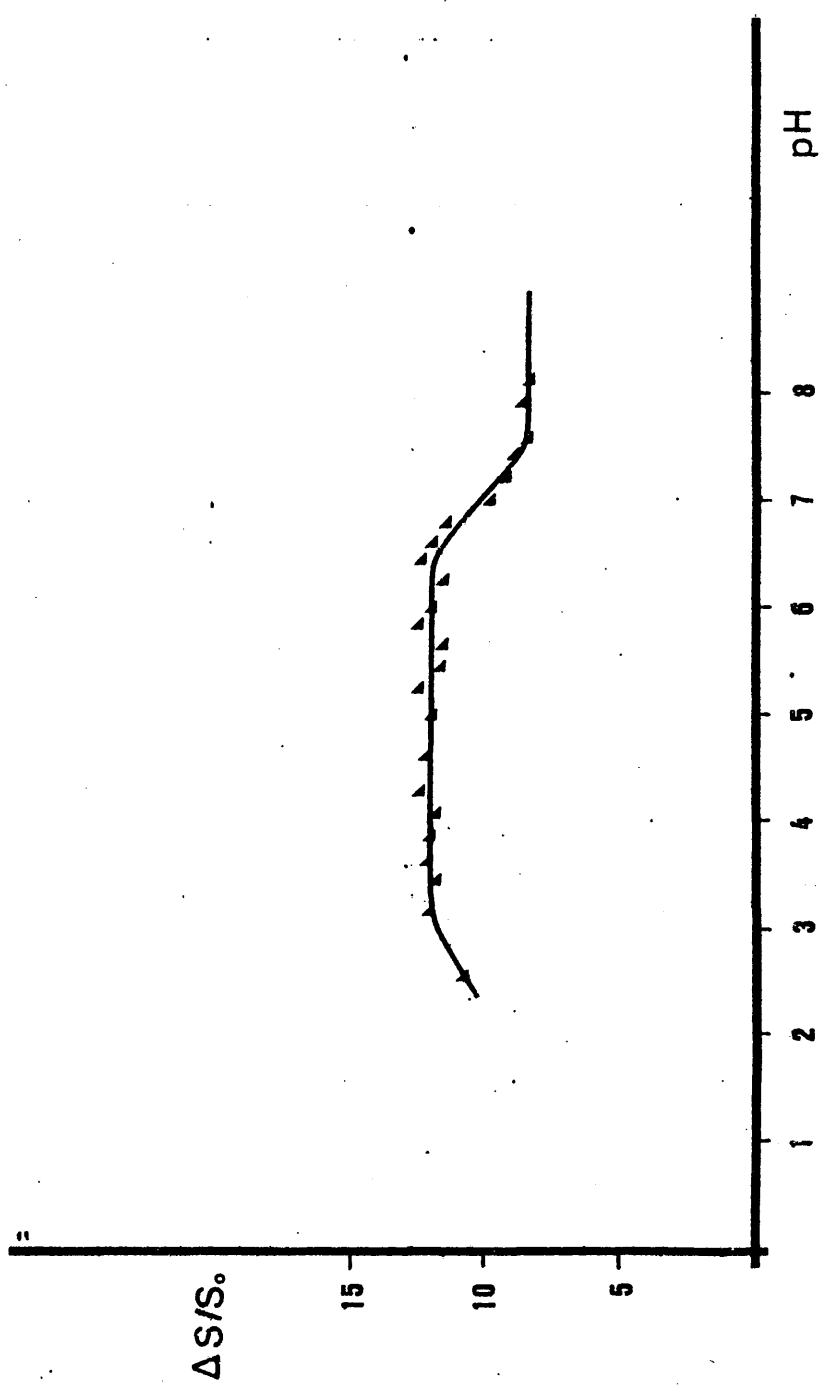


Fig. 6

cia similar con el pH, para la aglutinina del germen de trigo (WGA), observando que por debajo de $\text{pH} = 3'0$ y por encima de $\text{pH} = 7'5$, la intensidad de interacción decae abruptamente.

En consecuencia, y no existiendo un pH óptimo para la interacción liposomas - fitohemaglutinina, hemos escogido el valor de $\text{pH} = 5'45$ para nuestros trabajos, por hallarse situado hacia la mitad de la plataforma de máxima intensidad.

Cinética de la interacción

Uno de los aspectos fundamentales y que primero suele abordarse en los estudios con lectinas, es la velocidad de aglutinación, ya sea de liposomas ó de células totales.

Como puede fácilmente suponerse, dicha velocidad es dependiente de la concentración de lectina y de células, y proporcional a ellas. Cuando la concentración celular es baja, el proceso es lento, debido al reducido número de colisiones fructíferas que se producen. A concentraciones elevadas, la velocidad de aglutinación aumenta en virtud de la mayor probabilidad colisional. Sin embargo, y por razones que aún se desconocen, la / aglutinación de eritrocitos, es aparentemente mucho menos sensible a las variaciones en la concentración celular (180). En general, sólo para células nucleadas, resulta ser válida la norma que acabamos de mencionar.

Las modificaciones en la concentración de lectina, se traducen en un efecto aún más acusado, sobre la velocidad del proceso. Así, a concentraciones bajas de lectina, se demuestra que, previo a la aglutinación, ha de existir un mínimo de receptores ocupados, es decir, se necesita una determinada densidad de lectina en

la superficie celular. La velocidad de este primer eslabón de ocupación, es la limitante del proceso. Por el contrario, a concentraciones altas de lectina, una proporción considerable de ésta, queda unida antes de producirse la aglutinación. En este caso la segunda etapa de agregación celular, determina, por sí misma, la velocidad del proceso.

Redwood y cols (157), han estudiado la cinética del proceso de aglutinación de liposomas, que han incorporado monosialogangliósido, por la lectina del / germen de trigo (WGA). Igualmente, Surolia y cols (152) estudian la cinética de agregación de liposomas con monosialogangliósido (GM_1) por la lectina del *Ricinus communis*, calculando la constante de velocidad. El número de puntos de unión por μm^2 de la superficie del liposoma, altera considerablemente dicha constante de velocidad de la agregación. La dependencia de la velocidad inicial del proceso, con la concentración de / los reactantes, ha sido también investigada, por ejemplo para la limulina — aglutinina del *Limulus polyphemus* — y la WGA, con liposomas que contienen gangliósidos de eritrocito de caballo (153).

Curatolo y cols (154), estudian la influencia del pH y la temperatura, sobre la velocidad de agregación de vesículas de PC — que han incorporado lactosilceramida —, por la lectina del *Ricinus communis*. / Rendi y cols (150), utilizando liposomas de lípidos totales de eritrocito de conejo y humanos, han determinado la cinética de su agregación por la lectina de soja (SBA), la de germen de trigo (WGA), y la Con A. Al tiempo, comprueban la reversibilidad del proceso / una vez alcanzada la saturación, por adición de los azúcares específicos respectivos.

En nuestro caso, hemos restringido el estudio

a la determinación del tiempo infinito del proceso cinético. Fundamentalmente, nos interesaba conocer con exactitud el periodo de incubación mínimo, a que habrían de ser sometidas nuestras muestras, para tener seguridad de haber alcanzado la estabilización.

Un estudio más amplio de esta cinética, carece de sentido por el momento. La razón principal radica en su complejidad, ya que no disponiéndose de la fitohemaglutinina purificada, no puede descartarse la posible influencia en el proceso, de otra u otras sustancias contenidas en el extracto, y esto, escaparía a nuestro control.

Para el estudio del tiempo de incubación, hemos escogido condiciones de pseudo primer orden. Para ello, nos hemos asegurado de que en las preparaciones existiera siempre un exceso de liposomas en relación con la cantidad de extracto añadido. La prueba comprendía la determinación de dicho tiempo de estabilización, para tres concentraciones crecientes de extracto, que expresadas como relación (P/P) de extracto/PL, corresponden a : $31 \cdot 10^{-3}$ mg Exto/mg PL, $62 \cdot 10^{-3}$ mg Exto/mg PL, y $93 \cdot 10^{-3}$ mg Exto/mg PL.

Una serie de pruebas previas, permitieron estimar, que la interacción liposomas - fitohemaglutinina, se producía de una forma sorprendentemente rápida. Este hecho hubo de ser tenido en cuenta en el planteamiento de la mecánica del ensayo que describimos a continuación.

En primer lugar, y sobre un registro Y-t, se registra la señal de dispersión de la luz a 90° , debida a la suspensión de liposomas en ausencia de extracto. Acto seguido se procedía a la inyección de la cantidad conveniente de éste, mediante microjeringa, en la misma cubeta que contenía los liposomas, procurando

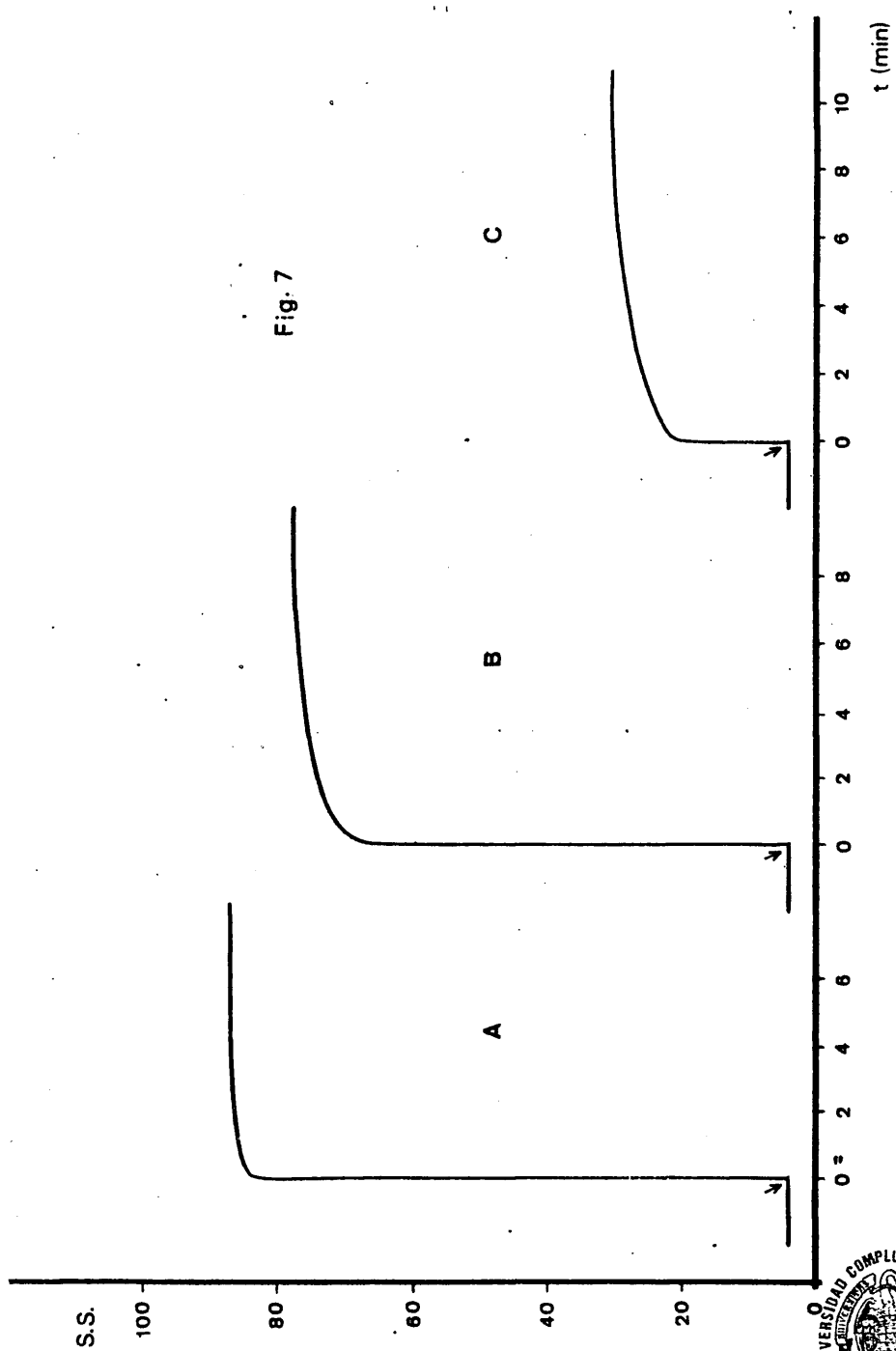
realizar al tiempo una agitación rápida de la muestra. El tiempo muerto comprendido desde el inicio de la inyección hasta la apertura de obturadores y comienzo del registro, fué en todos los casos < 10 segundos.

La Fig (7), muestra los resultados obtenidos para cada una de las tres concentraciones de extracto empleadas. El trazo inicial paralelo al eje de abscisas corresponde a la señal de los liposomas solos, quedando marcado sobre él, el momento de la adición del extracto.

A la vista de estos registros, puede comprobarse como en realidad la reacción es muy rápida. No obstante existen claras diferencias en cuanto al tiempo de estabilización, para las distintas proporciones de extracto. Así por ejemplo, mientras que para la concentración de $3.1 \mu\text{g Exto/ml}$ (C), se necesitan 10 min. para alcanzar la estabilidad, con una concentración doble — $6.2 \mu\text{g Exto/ml}$ (B) — sólo son necesarios 7 min., y finalmente en el caso de concentración triple — $9.3 \mu\text{g Exto/ml}$ (A) — simplemente 3 min. son suficientes.

Por consiguiente, y en base a estos resultados, decidimos tomar un tiempo de 15 min. como periodo de incubación mínimo, ya que al cabo del mismo, tenemos la seguridad de que no se produce ninguna evolución en nuestro sistema.

Consideramos interesante resaltar el hecho de que ésta cinética no se refiere a la primera etapa de unión de la lectina a nuestros modelos de membrana sino que en realidad refleja la velocidad de desencadenamiento de los fenómenos que son consecuencia, directa ó indirecta, de esa unión.



Efecto de la concentración de fitohemaglutinina y de liposomas.

Habiendo establecido en las pruebas previas / que acabamos de describir, los parámetros y condiciones básicas de trabajo, el primer aspecto de la interacción liposomas - fitohemaglutinina que nos interesa investigar, es la dependencia del grado de interacción con la concentración de extracto.

En primer término, se llevó a cabo un ensayo en el que empleando la misma concentración de liposomas (92% PC + 8% DCP) — 0'1 mg PL/ml — que en experiencias anteriores, se determinaba el incremento en / la dispersión Rayleigh a 90° debido a la adición de cantidades crecientes de extracto.

En cada muestra, la adición del extracto sobre la dispersión de liposomas, iba seguida de agitación / inmediata durante 15 seg. A continuación eran mantenidas a 25°C en baño termostaticado durante un periodo / no inferior a 15 min. antes de realizar la medida. Como en ocasiones anteriores, se disponía al tiempo, y para cada muestra, un blanco de liposomas y otro de extracto, ambos en tampón.

Para la elaboración de los resultados, hemos hecho uso de nuevo, del criterio de Redwood en su trabajo sobre la WGA y liposomas que han incorporado sialoglicoproteína (156). Así, en la Fig (8) quedan representados frente a la concentración de extracto los datos de dispersión de la luz, expresados como diferen

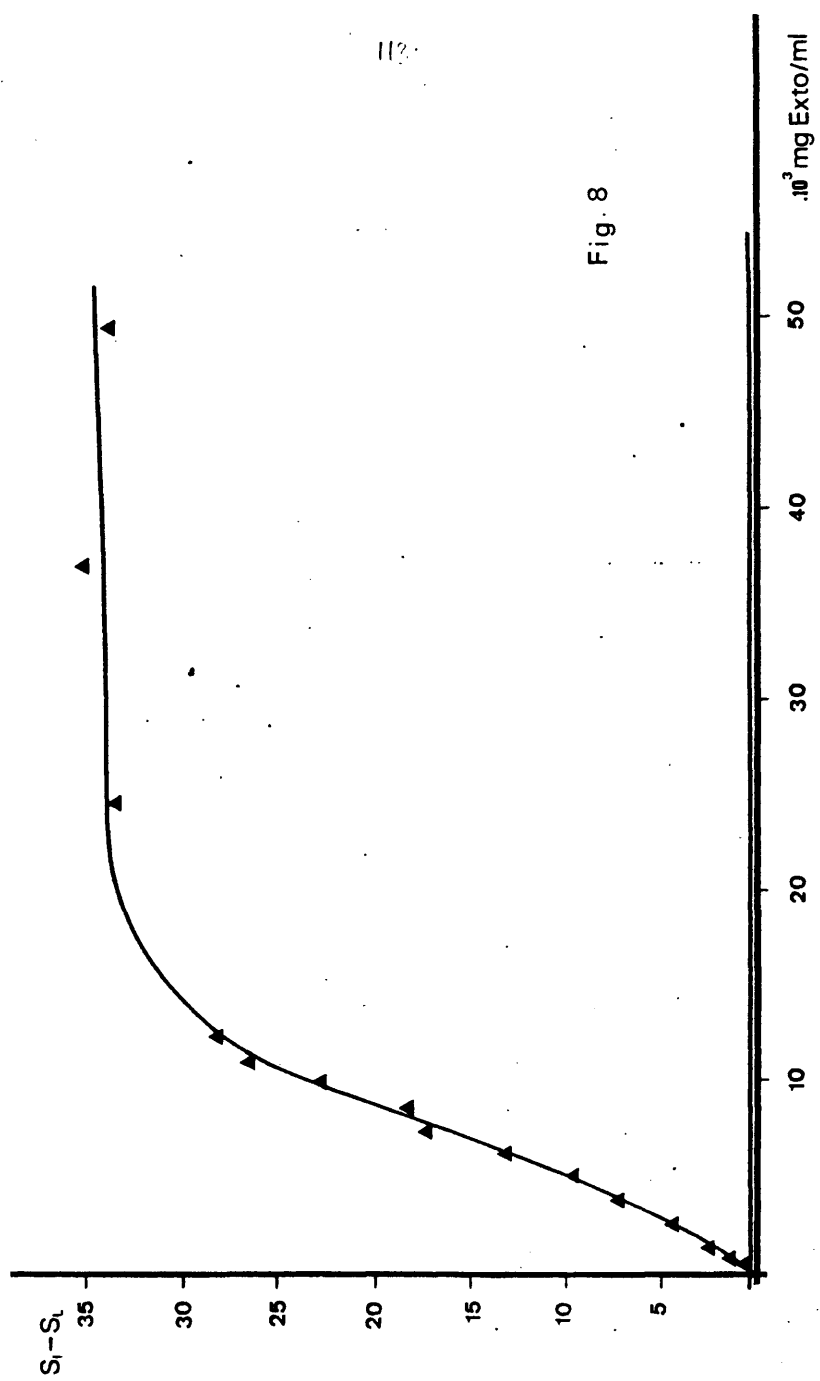


Fig. 8

cia entre la señal debida a la interacción, y la correspondiente al blanco de liposomas; Tabla IV.

Muy próxima al eje de abscisas y paralela a / éste queda representada la señal del extracto a las distintas concentraciones, una vez sustraída la señal del tampón. El hecho de que a la misma sensibilidad que / fueron realizadas las medidas de interacción, no se observen variaciones de la dispersión Rayleigh para concentraciones crecientes de extracto, resulta especialmente singular. Si la fitohemaglutinina del *Myrtus communis* fuera una macromolécula como en el caso de la / Con A, evidentemente la señal de dispersión de la luz, se vería proporcionalmente modificada con la concentración. Este comportamiento particular, aunque de una / forma meramente cualitativa, refuerza nuestra hipótesis según la cual, la fitohemaglutinina del mirto no poseería un peso molecular superior a 10.000 .

Respecto a la interacción que nos ocupa, se puede apreciar que existe una proporcionalidad entre la señal de dispersión de la luz y la concentración de extracto añadido sobre los liposomas. Siendo dicha medida, reflejo del grado de interacción, podemos concluir, que éste depende de la concentración de aglutinina, la cual a su vez es directamente proporcional a la concentración de extracto.

Para las concentraciones más elevadas, se alcanza una situación de saturación. Sin embargo, según nuestra opinión, más bien debería denominarse pseudo-saturación, ya que no puede descartarse la posibilidad de que dicha señal aparente tenga su raíz en un fenómeno óptico de interferencia destructiva. Teniendo en / cuenta que a tan elevadas concentraciones de extracto debe esperarse la formación de grandes agregados o estructuras de fusión de tamaño considerable, la aparición

Dependencia de ΔS con la concentración de extracto.

(Exto) $\mu\text{g/ml}$	$S_I - S_L$	ΔS
0'31	0'5	0'3
0'62	1'2	1'0
1'24	2'3	2'1
2'48	4'2	4'0
3'72	7'1	6'9
4'96	9'5	9'3
6'2	13'0	12'8
7'44	17'2	17'0
8'68	18'0	17'8
9'92	22'7	22'5
11'16	26'4	26'2
12'4	27'9	27'7
24'8	33'3	33'1
37'2	35'1	34'9
49'6	33'6	33'4

$$S_L = 2'1 ; S_T = 0'1 ; \bar{S}_E = 0'3$$

T A B L A IV

de las interferencias mencionadas, sería más que probable (181).

Ya nos hemos referido con anterioridad a los estudios que con diversas lectinas, se han realizado sobre eritrocitos. En ellos, se demuestra, que la aglutinación, además de ser dependiente de la cantidad de lectina en el medio, lo es también de una segunda variable: la concentración de células. Por esta razón hemos extendido nuestro estudio de titulación, a dos concentraciones más de liposomas: 0'075 mg PL/ml y 0'05 mg PL/ml .

El planteamiento experimental y las condiciones de trabajo, son idénticas a las ya descritas.

Los resultados quedan resumidos en la Fig (9). En ella hemos representado la señal diferencial (ΔS) de dispersión Rayleigh a 90°, frente a la relación (P/P) de Exto/PL. La razón de utilizar ésta última relación para expresar la concentración de extracto relativa a la de liposomas, está en la simplicidad que con ello se tiene en la comparación de los tres trazados.

De esta forma puede apreciarse a simple vista, que para un mismo valor de la relación Exto/PL, la magnitud de la señal depende de la concentración de liposomas en el medio.

Asimismo se observa, que el trazado de estas curvas no es hiperbólico, sino que se asemeja, más bien, a una sigmoidea. Concretamente en el caso de la concentración menor de liposomas, es donde mejor se aprecia .

La explicación al trazado que siguen estas curvas, puede encontrarse en la existencia de un efecto cooperativo positivo.

En los múltiples estudios llevados a cabo con lectinas y membranas naturales, se han emitido diversas hipótesis para explicar la influencia de la concentración de lectina sobre la velocidad del proceso de aglu-

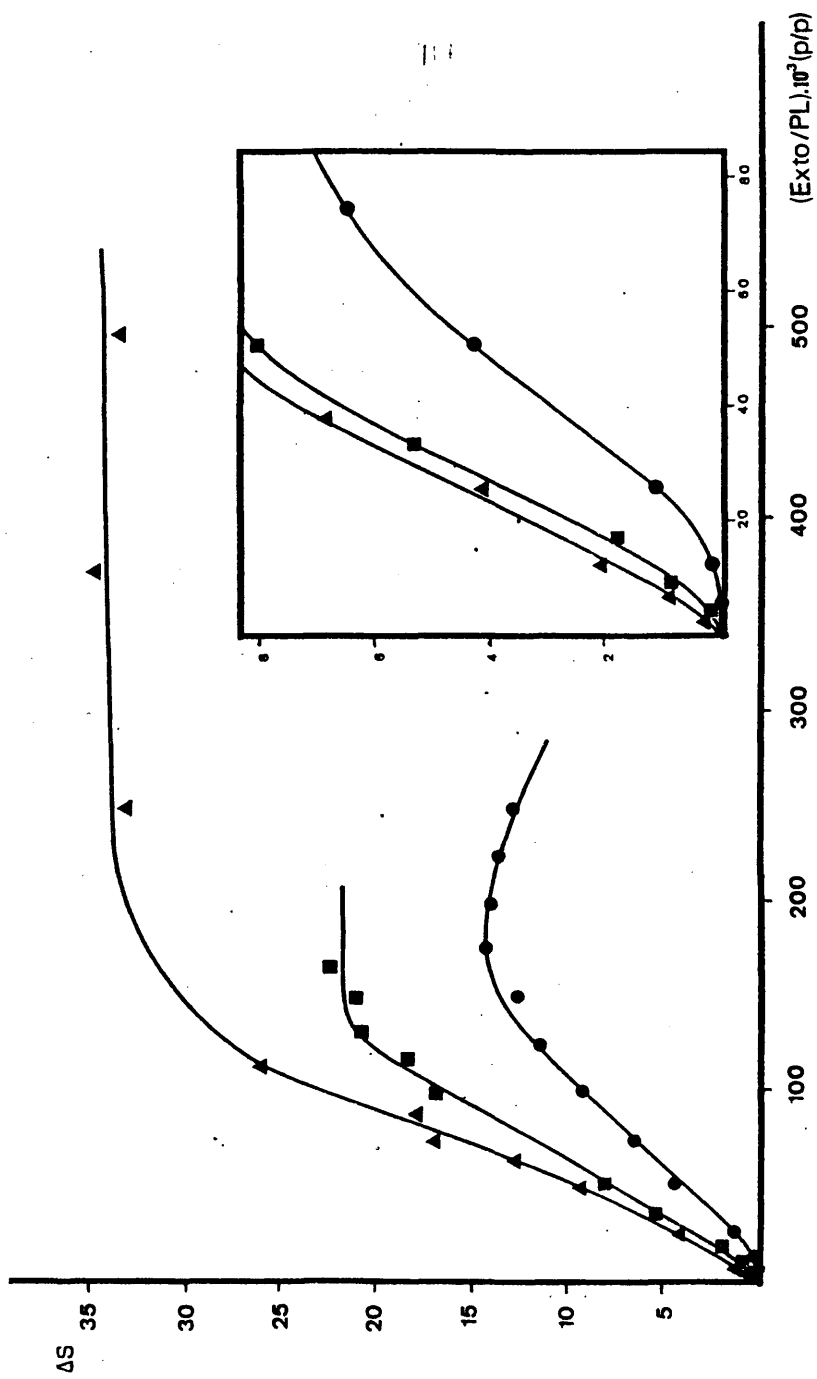


Fig. 9

tinación. Una de ellas sugiere que no todos los posibles puntos de unión, estarían implicados en el proceso de aglutinación, y que a concentraciones elevadas, se estarían produciendo uniones no específicas. Una segunda propone que a bajas concentraciones, sólo una / fracción del total de puntos de unión sobre la superficie celular, estarían ocupados, debiendo producirse una reorganización lateral en el plano de la membrana para incrementar las densidades locales de lectina y facilitar la aglutinación. Schmidt - Ullrich y cols (182), han demostrado que la unión de la Con A a microsomas / de timocito, es un proceso cooperativo positivo cuando la concentración de lectina en el medio es baja.

Por su parte, Reisner y cols (183), estudian do la unión de la lectina de soja (SBA) — con bajas concentraciones —, a eritrocitos humanos tratados con tripsina, han demostrado que el proceso muestra una / cooperatividad positiva igualmente.

Surolfa y cols (152) habían obtenido previamente, un efecto similar trabajando con liposomas que habían incorporado distintas proporciones de diversos gangliósidos, y estudiando su aglutinabilidad por la / Con A y la del *Ricinus communis*.

Finalmente, Redwood y cols (156, 157), presentan asimismo un perfil de cooperatividad positiva — para la aglutinación inducida por la WGA, tanto sobre liposomas con sialoglicoproteína, como sobre los que / contenían monosialogangliósido.

Todo ello refuerza la idea de que en nuestro caso bien pudiéramos estar asistiendo igualmente a un efecto de cooperatividad positiva. Sin embargo, nuevamente el hecho de no disponer de la fitohemaglutinina purificada, ó de un método de valoración específico, nos ha impedido llegar a conocer el número de moléculas

las unidas a los modelos de membrana.

Habiendo escogido como concentración de liposomas adecuada para nuestro trabajo, la de 0'1 mg / PL/ml, a la vista del resultado de esta experiencia, decidimos utilizar una concentración de extracto de 6'2 µg/ml, ya que la señal de interacción correspondiente, se sitúa ligeramente por debajo de la zona media del tramo ascendente de la curva; es decir, algo inferior al máximo de intensidad de dispersión Rayleigh. De esta forma se evita que la posible formación de agregados excesivamente grandes, pudiera perturbar las medidas.

Influencia de cationes divalentes .

Algunas lectinas, como ya se ha citado, poseen la peculiaridad, de requerir la presencia de iones específicos, para ejercer su capacidad aglutinante. Estos iones metálicos, juegan un papel que, aparentemente, no está relacionado con la neutralización de cargas, ó el aumento de interacciones hidrofóbicas. Así por ejemplo se ha descubierto la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} , en la estructura molecular de ciertas lectinas. Se cree, que dichas iones, son necesarios para la creación de los puntos activos de la / lectina, a los que se une el azúcar (184-186). En el caso de la Con A, que ha sido la más estudiada, los cationes le confieren un alto grado de estabilidad estructural protegiéndola frente a la inactivación térmica / (187, 188), y la hidrólisis enzimática (178).

Estas lectinas, en cuanto a su capacidad aglutinante se refiere, resultan además muy sensibles a / las variaciones de pH (40, 178).

El tampón que nosotros venimos utilizando — ác.cítrico/ PO_4HNa_2 (McIlvaine) pH= 5'45 —, por su naturaleza, tiende a formar complejos con los cationes divalentes, que de manera natural pudieran existir en el medio, secuestrándolos de este. A pesar de ello, la presencia de dichos elementos, no se manifiesta como / esencial para la actividad de la fitohemaglutinina del mirto. El grado de interacción de esta con los modelos de membrana, es similar, tanto en el medio tamponado como en solución salina de ClNa 0'9% .

No obstante, hemos considerado de interés, analizar la influencia, que sobre la afinidad de la fitohe maglutinina por los liposomas, pudiera tener la presencia de ciertos cationes divalentes, en distintas concentraciones, en el medio. Existía " a priori " la posibilidad de que dicha afinidad se viera reforzada, tal como ocurre con la lectina de soja (158).

En nuestras experiencias, hemos escogido tres de los cationes más frecuentemente citados en la bibliografía: Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} . En cada caso, se utilizaron concentraciones crecientes de Cl_2Ca , Cl_2Mg ó Cl_2Mn , correspondiendo concretamente, a 1mM, 2mM, 4mM y 10mM. Todas las muestras, fueron preparadas en medio salino de ClNa 0'9%, quedando suprimido el uso del tampón ác.cítrico/ PO_4HNa_2 , para evitar la posible distorsión de los resultados por el efecto que acabamos de mencionar. La concentración final de liposomas, fué de 0'1 mg PL/ml, y la correspondiente de extracto, 6'2 $\mu\text{g/ml}$. Para los ensayos de los tres cationes, y en cada una de sus concentraciones, se dispuso de una serie de muestras blanco / de liposomas y de extracto. Asimismo, como control, y a fin de la ulterior comparación de los resultados, en cada uno de los tres ensayos se prepararon las muestras correspondientes a interacción, blanco de liposomas y / blanco de extracto, en ausencia de cationes divalentes, y en el mismo medio de ClNa 0'9%.

En todas las preparaciones, se dispusieron en primer lugar, los volúmenes apropiados de solución madre de liposomas, añadiendo a continuación, los correspondientes de la solución madre de Cl_2Ca , Cl_2Mg ó Cl_2Mn para la concentración requerida. En último término, se procedió a la adición de los volúmenes apropiados de extracto.

El grado de interacción, fué estimado mediante

medida de la dispersión Rayleigh a 90° ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$), expresándose finalmente los resultados en forma de señal relativa ($\Delta S/S_0$). Las tablas (V, VI, VII), resumen los datos correspondientes a la influencia de los tres cationes divalentes sobre la señal debida a los liposomas (Tabla V), sobre la señal del extracto (Tabla VI), y sobre la señal relativa de interacción (Tabla VII). En ellas quedan reflejados los valores de dispersión de la luz, tanto en ausencia de cationes, como en su presencia a las distintas concentraciones empleadas, con el dato del error standard de la media para cada concentración y catión. Aportamos aquí este dato, dada la existencia de una cierta dispersión de los resultados.

Analizando el efecto sobre la señal de los liposomas, se puede deducir que en los tres casos sólo existe una ligera alteración, respecto a la señal control, como consecuencia de la presencia de los cationes. El orden de magnitud de dicha alteración parece ser mayor en el caso del Mn^{2+} , que en el del Ca^{2+} , y en este a su vez mayor que en el Mg^{2+} . Con estos dos últimos cationes, parece existir además, una concentración umbral, que para el Mg^{2+} sería de 4mM, y para el Ca^{2+} estaría situada entre 2 - 4mM. Para el caso del Mn^{2+} , aparentemente no existe, si bien no se puede descartar la posibilidad de que sea inferior a 1mM.

No obstante el incremento que se registra en la señal de dispersión de la luz por los liposomas, en presencia de cationes, la consecuencia del efecto que estos producen, no deben atribuirse — de acuerdo con los trabajos de Lansman (189) —, a una dimerización.

A fin de descartar la posibilidad de que las alteraciones de señal que se registran cuando existen diferentes concentraciones de cationes en el medio, fue

Efecto de los cationes divalentes sobre la señal de los liposomas

	No Me ²⁺				1 m M	2 m M	4 m M	10 m M
Ca ²⁺	8'5 + 0'1	8'6 + 0'2	9'2 + 0'4	9'1 + 0'2	9'8 + 0'2			
Mg ²⁺	7'3 + 0'2	7'3 + 0'6	7'6 + 0'3	8'1 + 0'4	8'7 + 0'4			
Mn ²⁺	8'5 + 0'1	9'1 + 0'4	9'6 + 0'6	9'9 + 0'6	10'6 + 0'5			

T A B L A V

Efecto de los cationes divalentes sobre la señal del extracto en solución salina.

	No Me^{2+}	1 m M	2 m M	4 m M	10 m M
Ca^{2+}	$2'0 \pm 0'2$	$2'2 \pm 0'1$	$2'1 \pm 0'3$	$2'1 \pm 0'6$	$2'3 \pm 0'3$
Mg^{2+}	$2'2 \pm 0'4$	$2'0 \pm 0'1$	$2'2 \pm 0'3$	$2'1 \pm 0'6$	$2'4 \pm 0'3$
Mn^{2+}	$2'8 \pm 0'2$	$2'2 \pm 0'6$	$2'1 \pm 0'3$	$2'6 \pm 0'1$	$2'9 \pm 0'5$

T A B L A VI

Efecto de los cationes divalentes sobre la señal de interacción ($\Delta S/S_0$)

	No Me^{2+}	1 m M	2 m M	4 m M	10 m M
Ca^{2+}	$6'0 \pm 0'3$	$4'1 \pm 0'2$	$4'7 \pm 0'6$	$4'8 \pm 0'4$	$5'0 \pm 0'3$
Mg^{2+}	$6'0 \pm 0'3$	$5'4 \pm 0'5$	$6'3 \pm 0'3$	$6'0 \pm 0'6$	$5'9 \pm 0'4$
Mn^{2+}	$6'0 \pm 0'3$	$3'8 \pm 0'2$	$5'3 \pm 0'6$	$4'9 \pm 0'3$	$4'9 \pm 0'6$

T A B L A VII

ran debidas a un efecto osmótico, se realizaron una serie de experiencias para estudiar este aspecto. Las medidas de dispersión Rayleigh a 90° , de distintas suspensiones de liposomas preparadas a partir de una solución madre, diluyendo con agua destilada y con diferentes concentraciones de ClNa , demuestran que la influencia de los cationes con que se ha trabajado, no es debida a una perturbación osmótica.

Por otra parte, se comprueba [189] que la adición de EDTA, revierte completamente los efectos de agregación inducidos por cationes divalentes. Tales efectos sobre los liposomas, han sido objeto de estudio de diferentes autores [190].

La influencia de los cationes divalentes, se manifiesta de forma más acusada sobre aquellos modelos en cuya composición existe un elevado porcentaje de / fosfolípidos ácidos. Tal ocurre, por ejemplo, cuando se incorpora fosfatidil-serina (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidil inositol (PI), ó fosfatidil glicerol (PG), y siendo la causa fundamental, la carga neta negativa, que dichos fosfolípidos presentan.

Lansman y cols [189], han investigado el efecto de una serie de cationes — Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} y La^{3+} —, sobre liposomas de PA y PS, mediante la técnica de "stopped flow". De sus resultados concluyen, que en primer término tiene lugar una / agregación de las estructuras, etapa en la cual es posible revertir el proceso por adición de un exceso de EDTA; posteriormente se produce la fusión de aquellas, en una etapa mucho más lenta proporcionalmente.

Los mismos autores, aportan un dato de concentración umbral para el efecto del Ca^{2+} sobre liposomas de PA, correspondiente a 4 mM. Otros autores [191], utilizando liposomas de PS y tiempos de incubación de

aproximadamente 1h, observan la fusión de los mismos / con concentraciones de Cl_2Ca del orden de 1 mM, incrementándose esta concentración umbral a 4 mM, cuando los liposomas están constituidos por PC y PS al 50 %. El grado de fusión en el primer caso, o más probablemente su velocidad, aumenta con la concentración de Ca^{2+} , situándose la mitad del efecto máximo alrededor de la de 2 mM. La incorporación de cantidades crecientes de PC disminuye el grado de fusión, y así, este es menor del 10 % — tomando como 100 % el debido a liposomas de PS —, para una composición de 60 % PS + 40 % PC:

Igualmente, la dilución del PA en PC, (189), posee un efecto marcado sobre la constante de equilibrio y la cinética de la reacción de dimerización que se produce con estos liposomas por Ca^{2+} . Así por ejemplo, una dilución del 50 % descende la amplitud de la reacción hasta sólo un 4 % — supuesto el 100 % para / liposomas de PA —, y duplica el tiempo para alcanzar la mitad del máximo de reacción.

Finalmente, citaremos los trabajos de Rendi y cols [158], que trabajando con liposomas preparados a partir de los lípidos totales de eritrocito, no apreciaba ningún cambio en la turbidez de la suspensión, por adición de Cl_2Ca 2 mM.

De todo lo anteriormente expuesto, parece / desprenderse que la velocidad y grado de la agregación por cationes, es más bien una propiedad de la membrana lipídica " per se ", que del tipo de catión, o del fosfolípido cargado negativamente.

En nuestro caso, y según los datos aportados por Papahadjopoulos y cols [190], no debe producirse una fusión de las vesículas, sino más bien una agregación, aunque, como ya hemos mencionado, no llegue a formarse el dímero.

Las diferencias que reflejan los resultados en la efectividad de los tres cationes, pudieran hallarse relacionadas con la distinta densidad superficial / de carga de cada uno de ellos, en su concha de solvatación.

En cuanto al efecto que la presencia de estos cationes en el medio, tiene sobre la señal de dispersión de luz debida al extracto, los resultados — resumidos en la tabla (VI) — indican, que dicho efecto, de existir, no es claramente significativo. Las variaciones en la magnitud de la señal, comparadas con las correspondientes a la influencia de la composición del tampón — en que sin duda existe un efecto —, son despreciables.

La tabla (VII) refleja los resultados obtenidos para la interacción liposomas - fitohemaglutinina, expresados como $\Delta S/S_0$, en presencia de los cationes divalentes. La influencia que estos ejercen sobre aquella, parece tener un sentido negativo. El comportamiento de los tres cationes es semejante desde el punto de vista cualitativo. Cada uno de ellos manifiesta el máximo de inhibición a una concentración de 1 mM. Con concentraciones superiores, se aprecia una disminución del efecto negativo, llegando a hacerse éste independiente de aquellas.

A la concentración de 1 mM, el orden de efectividad es: $Mn > Ca \gg Mg$. A 2 mM el Mn^{2+} ya no ejerce ninguna influencia sobre la magnitud de la interacción, y en el caso de Ca^{2+} y Mn^{2+} , puede observarse que a las concentraciones de 2, 4 y 10 mM, su grado de inhibición es similar.

Habida cuenta de que en la primera etapa de contacto de los liposomas con el catión, según se ha comentado, el resultado es una neutralización de la /

carga neta de las vesículas que favorece su agregación, el efecto negativo que se apreciaba sobre la interacción, debe encontrar su explicación en la etapa ulterior de adición del extracto. En efecto, puesto que la neutralización de la carga neta — total ó parcialmente —, conduce a una disminución de la barrera energética que se opone al contacto entre liposomas, el resultado de la presencia de cationes en el medio, debiera ser en el sentido de facilitar la interacción. El hecho de que no sea así, sino en sentido opuesto, nos hace pensar en la posibilidad de que la fitohemaglutinina del mirto posea una carga neta positiva. Sobre este supuesto, el descenso del grado de interacción en presencia de cationes, podría explicarse de la siguiente forma: existiendo en los liposomas una carga neta superficial negativa, la carga opuesta de la aglutinina, jugaría en favor de la interacción. Si en razón de la presencia de cationes, la carga neta de los modelos disminuye, en cuanto mayor es la neutralización de carga menos se facilita el acceso de la fitohemaglutinina a los liposomas.

A partir de la concentración de 2 mM de cationes, y como acabamos de mencionar, el efecto negativo disminuye. Es también a partir de esta concentración cuando, en general, comienza a manifestarse la agregación de los liposomas. Por ello, la explicación de este cambio en la tendencia negativa ejercida por los cationes podría venir explicada, simplemente, porque cuando la aglutinina accede a los liposomas éstos ya están parcialmente agregados, por lo que esta etapa dejaría de jugar un papel limitante en el proceso de fusión.

Microscopía electrónica.

El hecho constatado de que se establece una interacción entre la fitohemaglutinina del mirto y liposomas de fosfolípido puro, cuyas consecuencias son dependientes de la concentración de extracto en el medio, nos conduce a plantearnos el tipo de fenómeno que está teniendo lugar. En efecto, de los estudios de lectinas utilizando estos modelos de membrana, con algún componente glicoproteico ó glicolipídico incorporado, se desprende que, en general, se produce una agregación de tales estructuras, reversible por adición del azúcar que inhibe específicamente a la lectina en estudio.

Nosotros, al igual que otros autores, hemos hecho uso de la microscopía electrónica, a fin de dilucidar el tipo de proceso que se presenta en nuestro sistema.

El método experimental, ya ha sido descrito / en su detalle en el capítulo de Materiales y Métodos. Simplemente recordar en este punto, que se dispuso en principio de una muestra de liposomas solos, y otras tres en las que se había provocado la interacción con concentraciones diferentes de extracto.

Las Figs. (10, 11, 12, 13, 14) constituyen la reproducción fotográfica de algunos de los campos / más representativos observados al microscopio. De la primera de ellas, correspondiente a la dispersión de liposomas en ausencia de extracto, puede deducirse que el tamaño de dichas estructuras unilamelares, es del orden de 410 Å. El aspecto general, es el típico que presen-

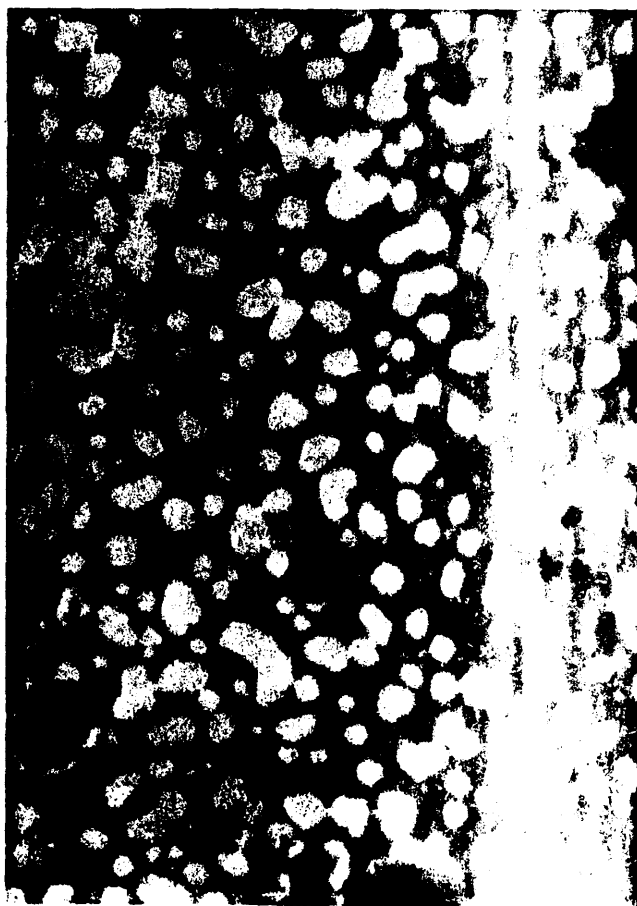


Fig. 10.- Liposomas unilamelares de PC-DCP (x 140.461)



Fig. 11.- Aspecto que presenta la preparación de liposomas (PC-DCP) tras la adición del extracto de mirto (I) (x 71.300)

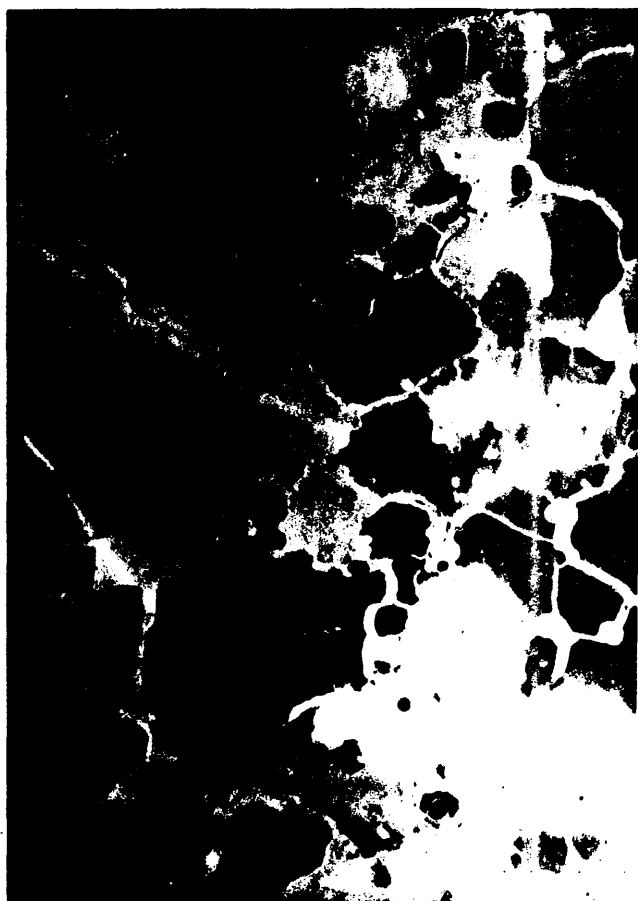


Fig. 12.- Aspecto que presenta la preparación de liposomas (PC-DCP) tras la adición del extracto de mirto (II) (x 46.000).



Fig. 13.- Detalle de la estructuración en multibicapas, en las masas lipídicas fundidas por acción del extracto de mirto (I).
(x 150.040).



Fig. 14.- Detalle de la estructuración en multibicapas, en las masas lipídicas fundidas por acción del extracto de mirto (II). (x 185.380).

tan estas preparaciones. Las estructuras liposómicas / aparecen blanquecinas ya que la solución de contraste _ no ha logrado penetrar en ellos; esto no resulta sorprendente ya que estos modelos son en general poco permeables.

En las Figs (13, 14) puede apreciarse como _ en presencia de extracto se produce un fenómeno de fusión de los liposomas. Dicho proceso, daría comienzo / por la formación de grandes estructuras cerradas (Fig. 11) que a su vez al fundir, darían lugar a la aparición de extensas masas de fosfolípido. El análisis detenido de estas masas, demuestra que en ellas se conserva la estructuración en bicapa (Fig. 12), detalle éste , especialmente significativo, como comentaremos más adelante.

Resultados semejantes a los que acabamos de / describir — pero mediante la técnica de criofractura—, han sido obtenidos por van der Bosch y cols (160) con la Con A. Empleando liposomas de DPPC — sin glicoproteína incorporada — dichos autores observan que la consecuencia de la interacción es la formación de grandes extensiones de multicapas.

Por su parte, Redwood y cols (156, 157) en sus estudios sobre la lectina del germen de trigo (WGA), a los que hemos aludido repetidas veces, obtienen dos _ tipos de comportamiento. En el caso de liposomas que han incorporado sialoglicoproteína (156), la adición de / cantidades crecientes de WGA, revierte en la formación de agregados, compuestos en su mayoría de vesículas individuales, y cuyo tamaño es proporcional a la concentración de WGA añadida. Se comprueba asimismo, que la / adición de N - Ac - glucosamina a las mezclas liposomaslectina, reduce considerablemente el tamaño de dichos / agregados.

Con liposomas que contienen monosialogangliósidos (157), el efecto producido por la WGA, es el contrario. Es decir, la observación al microscopio electrónico de muestras que han sido incubadas durante periodos de tiempo sucesivamente crecientes, revela la formación de estructuras progresivamente mayores. Del análisis del diámetro de las nuevas estructuras, los autores deducen que ha tenido lugar la formación de dímeros y trímeros, por fusión de las vesículas primitivas. Sin embargo en este caso, no se alcanza la formación de masas extendidas de fosfolípido en multibicapa.

A fin de descartar la posibilidad de que la fusión de nuestros liposomas fuera debida a la acción de alguna sustancia de naturaleza detergente contenida en el extracto, y no a la fitohemaglutinina, se llevó a cabo una prueba complementaria comparativa. En ella se observó el efecto producido sobre nuestros modelos, por una sal biliar.

Diferentes autores han estudiado los efectos, tanto de las sales biliares como de detergentes en general — Triton X-100 —. Para ello emplean medidas de turbidez y de permeabilidad al cromato potásico, así / como las correspondientes observaciones al microscopio electrónico. De esta manera, Weissmann (192) demuestran que el Triton X-100, produce una disrupción total de las estructuras liposómicas en estado " fluido ". Inoue y Kitagawa (193), observan que este mismo detergente afecta a la permeabilidad siendo, a bajas concentraciones, más susceptibles los liposomas en estado " sólido ", que los que se encuentran en estado " fluido ". No obstante, a concentraciones elevadas de Triton X-100 (194), estas últimas estructuras quedan destruidas. El estudio de la influencia de la temperatura, en el efecto de este detergente sobre liposomas de DPPC

(195), demuestra que la formación de micelas mixtas, es más favorable por encima de la temperatura de transición de dicho fosfolípido.

Por lo que respecta a las sales biliares, detergentes biológicos, solubles en agua con formación de / micelas, la presencia de fosfolípidos como la PC, rebaja considerablemente su concentración crítica. Richards y Gardner (196), han investigado los efectos producidos por soluciones de taurocolato y glicocolato, sobre liposomas de PC — estado fluido —, y de DPPC — estado sólido —, a diferentes temperaturas y pH. Mientras que para los primeros, los resultados demuestran que a 21°C se ha destruido totalmente la ordenación en bicapa con formación de estructuras coralinas, no es sino a 37°C cuando empieza a apreciarse un efecto similar / en los liposomas de DPPC.

Nuestra experiencia en este sentido, consistió en la comparación por microscopía electrónica, del aspecto de una preparación de liposomas después de ser / tratada con deoxicolato Na (1'2 mM), y tras su interacción con el extracto. Esta segunda situación, que / ya ha sido descrita anteriormente, conduce a la formación de grandes masas de fosfolípido estructuradas en bicapa. La acción del deoxicolato por el contrario, produce la destrucción total tanto de la vesícula, como / de la ordenación en bicapa.

De la conjunción de todos los resultados obtenidos en estos ensayos de microscopía electrónica, podemos concluir que la acción del extracto sobre los modelos de membrana (92 % PC + 8 % DCP), se traduce en una fusión de los mismos, apareciendo grandes masas, — que conservan la ordenación en bicapa. La fitohemaglutinina contenida en este extracto de mirto, parece revelarse nuevamente como principal responsable del efecto.

Pruebas de inhibición por azúcares.

La primera evidencia de que la interacción entre lectinas y células está mediada por azúcares, fué aportada por Watkins y Morgan en 1.952. Estos autores observaron que la capacidad de aglutinación de algunas lectinas, podía ser neutralizada por carbohidratos sencillos. El hecho fué interpretado como un efecto competitivo entre el azúcar en solución, y el receptor en la superficie celular, al igual que ocurre entre el hapteno y el complejo antígeno - anticuerpo. De esta forma, el azúcar quedaría fijado a los puntos activos de la lectina, bloqueándolos e impidiendo así que el proceso de aglutinación se produzca.

Sin embargo, la inhibición por azúcares de la capacidad aglutinante de ciertas lectinas, no es una prueba definitiva de que los receptores en la membrana plasmática, tengan una composición similar. Gordon y cols (1.972), y Cuatrecasas (1.973), han apuntado que el azúcar podría actuar induciendo cambios alostéricos en la molécula de lectina, lo que anularía su capacidad de reconocimiento de los receptores en la célula. Pflumm y cols (197), Grimaldi y Sykes (198), habían observado ya con anterioridad estos cambios conformacionales, no obstante la hipótesis de que las lectinas poseerían dos tipos de puntos activos: uno para el azúcar y otro para el anclaje en la superficie celular, no ha encontrado hasta el momento confirmación experimental.

Por otra parte, hemos de resaltar que según

la clasificación que hace Ochoa (176) de las lectinas, aquellas que presentan especificidad química y serológica, ó simplemente química, constituyen el grupo menos numeroso. En efecto, sólo una minoría de las lectinas son específicas de grupo — sólo 90, de 800 ensayadas — y las que se inhiben " in vitro " por azúcares, representan un número algo superior. Entre las / lectinas descubiertas hasta la fecha, existe por tanto un amplio grupo, cuyo mecanismo de aglutinación parece requerir una determinada disposición estérica del resto glucídico, que sólo se da en la superficie del eritrocito.

En cuanto a la fitohemaglutinina del *Myrtus / communis*, las investigaciones de Ortega y cols para encontrar, entre los más comunes, un carbohidrato que inhibiera específicamente su capacidad de aglutinación — de hematíes, no dieron resultado positivo.

Nosotros decidimos ensayar de nuevo estos azúcares y alguno más — vease Materiales y Métodos — con nuestro sistema de modelos de membrana. Las posibilidades de detección de un efecto inhibitorio, eran al tiempo, superiores, ya que las medidas de dispersión de la luz a 90°, representan indudablemente un método de sensibilidad superior frente a la aglutinación en placa y detección a " ojo desnudo ".

El diseño de estas pruebas se diferencia de / las anteriores sólo en su primera etapa, en que una solución de extracto, en el medio tamponado, conteniendo el azúcar en estudio, era incubada durante 5 - 10 min., antes de ser añadida en la proporción adecuada a la / dispersión de liposomas. El resto de condiciones tales como la agitación, tiempo y temperatura de incubación antes de la medida, fueron idénticas a las observadas en otros ensayos.

La experiencia inversa a esta, es decir, una vez producida la interacción, ensayar su reversibilidad por los diferentes azúcares, no llegó a intentarse. La razón de ello radica en el hecho ya mencionado en / el apartado anterior, de que la consecuencia de esta interacción es una fusión de las estructuras vesiculares, lo que elimina toda posibilidad de volver a la situación primitiva de liposomas unilamelares.

De las medidas de dispersión Rayleigh a 90° - ($\lambda_{ex} = 500 \text{ nm}$), hemos podido deducir, que la presencia de los diferentes azúcares en el medio, no modifica la señal debida al extracto, ni tampoco la correspondiente a la dispersión blanco de liposomas.

Los resultados de la interacción para tres / concentraciones distintas de azúcar en el medio — 1mM, 5 mM y 50 mM — quedan resumidos en la tabla (VIII). En ella se ha expresado el grado de interacción en tanto por ciento, tomando como 100 % de referencia, la señal relativa ($\Delta S/S_0$) de la interacción en ausencia / de carbohidrato.

Teniendo en cuenta que una variación de al menos $\pm 5\%$, es atribuible al error propio de la medida, los datos no parecen reflejar la existencia de ningún efecto específico de inhibición. Sólomente en el caso de la D- Manosa, llega a producirse un descenso del / 14 % en la señal relativa. Sin embargo, opinamos que este efecto no debe ser tomado en consideración, ya que tiene lugar para una concentración de 50 mM de dicho azúcar en el medio, y ello supone ya una concentración relativamente elevada en comparación con las que habitualmente se utilizan en ensayos de inhibición específica.

Uno de los resultados que llama particularmente nuestra atención, es el de la N - Ac glucosamina.

Inhibición de la interacción por Azúcares

$\Delta S/S_0$				
Azúcar	No Az.	1 m M	5 m M	50m M
D(+) Glucosa	100	95'7	99'0	90'4
D(+) Galactosa	100	96'2	92'7	92'0
D - Manosa	100	96'5	101'0	86'5
D - Arabinosa	100	101'0	97'8	96'8
D - Glucosamina	100	102'6	101'3	91'1
N -Ac-Glucosamina	100	97'5	95'1	94'7
N-Ac-Galactosamina	100	99'1	97'6	94'6
Salicina	100	100'5	98'2	91'0

T A B L A VIII

Habiendo observado en las pruebas previas con el extracto que la fitohemaglutinina poseía una extraordinaria afinidad por matrices de Quitina — polímero de N -Ac-glucosamina —, sería de esperar en principio, que tal como ocurre con la WGA [17], el monómero presentara una actividad inhibidora notable. Su aparente falta de especificidad por la fitohemaglutinina del mirto, sólo podría explicarse en virtud de las observaciones de algunos autores, según los cuales, las lectinas parecen poseer una mayor afinidad por los oligosacáridos, que por los monómeros correspondientes, y que dicha afinidad aumenta con la longitud de la cadena. Esta explicación conduce a pensar, que la primera etapa de reconocimiento lectina - receptor, que depende de forma importante de aspectos estéricos, se vería reforzada por la participación de otro tipo de interacciones.

Influencia de la composición de los liposomas :

Efecto del Colesterol.

Las membranas plasmáticas de células eucarióticas, poseen en general esteroides en su composición. La influencia que dichos compuestos ejercen sobre las funciones de esta frontera celular, son sobradamente conocidas. En el caso particular del eritrocito, la proporción existente de colesterol en su membrana respecto al total de fosfolípidos, es de 0'8:1 (mol/mol) . Siendo éste, el primer tipo de célula sobre el que se ha investigado la actividad de la fitohemaglutinina del mirto, hemos considerado de interés, el llevar a cabo un estudio de la influencia que la incorporación en los liposomas (92 % PC + 8 % DCP), de cantidades sucesivamente crecientes de colesterol, tiene sobre la interacción de dicha fitohemaglutinina con estos modelos .

La incidencia que el descenso de la proporción de colesterol en los linfocitos, a causa de procesos patológicos, tiene sobre su aglutinabilidad por la Con A, y la movilidad de los receptores de ésta en la membrana, ha sido investigada por Ben-Bassat y cols (199), e Inbar y cols (47). Estos últimos, indican, que el incremento en la fluidez de la bicapa lipídica, en células leucémicas, se debe principalmente al descenso en la relación molar Colesterol: fosfolípidos.

El método seguido para la preparación de liposomas con colesterol incorporado, ha sido ya descrito en el capítulo de Materiales y Métodos. Las condicio

nes de temperatura, incubación, etc., con que se ha / operado, son idénticas a otras ocasiones, habiéndose _ empleado igualmente la medida de la señal de dispersión de la luz a 90° ($\lambda_{\text{ex}} = 500 \text{ nm}$), como indicativa del / grado de interacción.

Los resultados obtenidos, fueron elaborados para su expresión como señal relativa ($\Delta S/S_0$). Recordamos que venimos utilizando habitualmente esta expresión, cuando los liposomas no proceden de la misma preparación, ya que de esta forma se corrige el error que comportan las pequeñas diferencias de tamaño de estos modelos, siempre que aquel esté incluido dentro de unos determinados límites.

La Fig. (15) representa los datos de $\Delta S/S_0$ / frente al tanto por ciento de colesterol incluido en los liposomas. A simple vista, parece desprenderse del trazado, que proporciones crecientes de dicho componente lipídico, no influyen en la magnitud de la interacción, hasta alcanzar un límite. Este límite se sitúa sobre una proporción molar de PC : colesterol de 1 : 0'6 (37%). Para la proporción molar 1 : 1 — es decir 50% de colesterol — se aprecia un marcado descenso en la señal relativa, que pudiera ser atribuible a una situación de estabilidad de la bicapa, debida a la formación de un complejo PC : Colesterol 1 : 1 (mol/mol) / que ya ha sido postulado por diversos autores

Estos datos, no deben ser analizados estrictamente, en su aspecto cuantitativo, ya que no es posible descartar una ligera distorsión en los mismos, por efecto del tamaño de los liposomas en las distintas / preparaciones, y que en este caso conviene tomar en consideración.

En una serie de pruebas previas, se pudo observar que ciertas dispersiones de liposomas en las que,

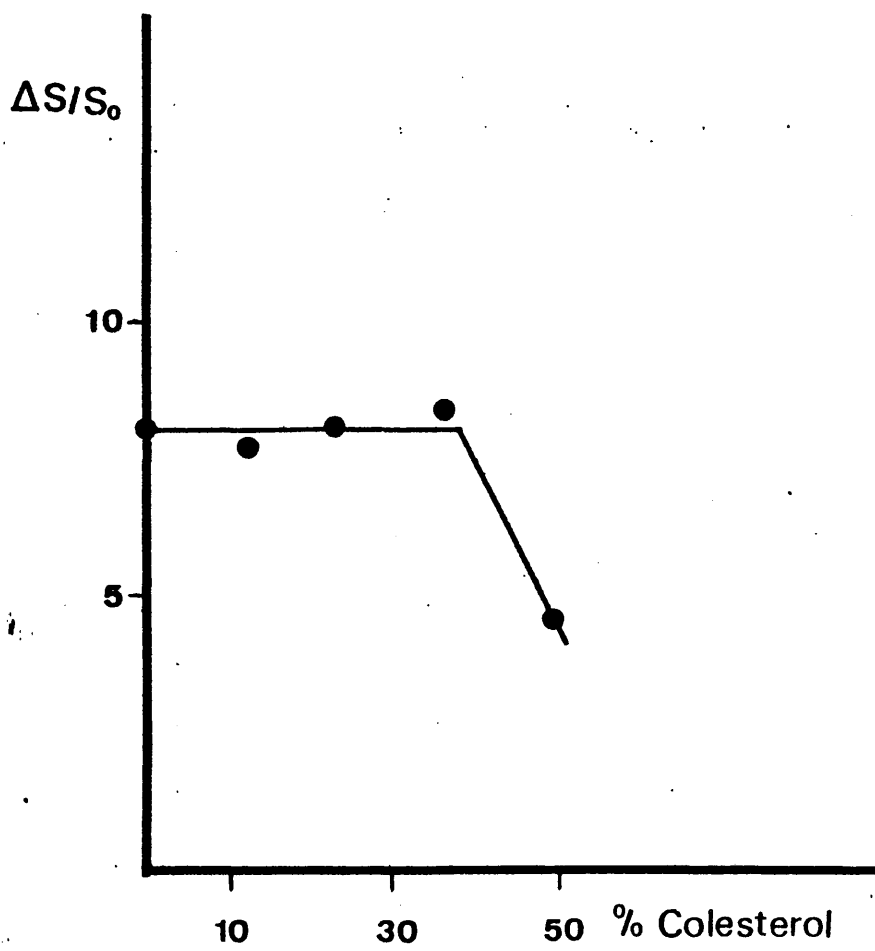


Fig. 15

a través de medidas turbidimétricas, podía presumirse la existencia mayoritaria de estructuras de gran tamaño, presentaban desviaciones respecto al comportamiento esperado en la interacción con el extracto de mirto. En efecto, las medidas de dispersión de la luz de las mezclas liposomas - extracto obtenidas con dichas preparaciones, eran inferiores a los valores registrados utilizando dispersiones constituidas por vesículas en la misma concentración pero de tamaño menor.

La causa de que el grado de interacción disminuya cuando las preparaciones contienen liposomas de gran tamaño, puede encontrarse en la menor superficie que queda expuesta a la acción de la fitohemaglutinina. Incluso pudiera ocurrir que además de ser estructuras mayores, estuvieran constituidas por más de una bicapa lipídica.

En los casos de partículas que han superado un determinado límite de tamaño, la señal de dispersión Rayleigh a 90° , no puede considerarse reflejo de las dimensiones reales de la partícula. La razón estriba en la aparición de fenómenos de interferencia de tipo destructivo, que distorsionan la medida.

A través de los numerosos estudios llevados a cabo con liposomas que incorporan colesterol, ha podido demostrarse que el tamaño de éstos, no varía apreciablemente siempre que la proporción de colesterol no supere el 30% (mol/mol) del total de lípidos constituyentes del modelo. Con proporciones más elevadas de este componente, y según ha quedado confirmado por diversas técnicas (200-203), el tamaño parece aumentar considerablemente.

En este punto hemos de hacer notar, que para nuestro sistema, el grado de interacción se mantiene invariante hasta un contenido de colesterol, /

próximo al 30% (mol/mol).

En base a los razonamientos e información que hemos anotado, insistimos en que los datos que acabamos de exponer pueden no ser rigurosamente comparables. No obstante, a juzgar por las medidas turbidimétricas de / las dispersiones de partida, sí reflejan, en nuestra _ opinión, al menos cualitativamente y de forma muy aproximada, el efecto que sobre la interacción supone, la / presencia de colesterol en la bicapa lipídica.

Influencia de la carga neta superficial de los
liposomas.

Uno de los factores que principalmente contri-
buye, en sentido negativo, a la agregación celular, es
la carga superficial. En efecto, ésta representa quizá
la más importante barrera de energía que se opone a /
las fuerzas de adhesión que tienden a agregar las célu-
las (204). En el caso del eritrocito esta carga se /
debe principalmente a los restos de ácido siálico que,
situados en la membrana, poseen sus grupos carboxilo _
ionizados.

El efecto repulsivo que comporta esta barrera
energética, puede ser superado gracias a la energía ci-
nética de que están afectadas las células en su movi-
miento. Si esto ocurre, podrían aproximarse los sufi-
ciente para permitir que las moléculas de lectina esta-
blezcan puentes intercelulares, cuya consecuencia inme-
diata sería la formación de agregados celulares.

Una de las posibles maneras de contrarrestar
la repulsión electrostática, consiste en la eliminación
de los restos de ácido siálico de la superficie celu-
lar, mediante digestión enzimática. También podría ope-
rarse neutralizando su carga por adición al medio de /
algún compuesto con carga neta contraria. Las protami-
nas pueden ser un ejemplo de moléculas utilizadas con
estos fines (204, 205).

Por otra parte la barrera eléctrica, depende _
de ciertos factores extrínsecos, tales como fuerza ió-

nica y constante dieléctrica del medio que contiene la suspensión celular.

El proceso de aglutinación comienza por tanto, una vez que el potencial ξ ha descendido por debajo de un valor crítico. El fundamento del empleo de tampones a los que se ha incorporado un polímero natural ó sintético, reside precisamente en el incremento que supone en la constante dieléctrica. Esto a su vez explica la reducción consiguiente en el potencial ξ . Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que al tiempo, concurren otros efectos; por ejemplo, la adsorción de los citados polímeros sobre la superficie celular, que contribuiría al enmascaramiento ó directamente neutralización, de los grupos cargados existentes en ella.

Hecho este breve planteamiento del problema / que nos ocupa, pasemos a analizar la situación que se presenta en nuestro sistema. Considerando que los liposomas están constituidos fundamentalmente por lecitina (PC), y que esta molécula es zwitterion en un amplio margen de pH — el comprendido entre 3'5 y 10'0 — la carga neta superficial que presenten estas estructuras, será debida fundamentalmente a la proporción de DCP incorporada — $pK_a = 3'9$ — ya que nuestro pH de trabajo es 5'45.

Aunque en experiencias anteriores ha quedado demostrado, que la consecuencia final de la interacción del extracto con los modelos de membrana es la / formación de grandes masas de fusión, es evidente que en las primeras etapas, ha de tener lugar la puesta en contacto de los liposomas. Por consiguiente, se debe esperar que un aumento en la carga superficial de aquellos, conduzca a una disminución en el grado de interacción.

Sin embargo, cabe una segunda posibilidad. Si

la interacción entre fitohemaglutinina y liposomas fue básicamente de naturaleza electrostática, el efecto observado por aumento de la carga superficial sería / muy distinto. La unión de la fitohemaglutinina a los grupos polares de las moléculas de fosfolípido, se vería reforzada ó disminuida dependiendo del signo de la carga neta de que estuvieran dotadas las vesículas:

Con objeto de verificar el tipo de comportamiento a que responde nuestro sistema, hemos realizado una serie de experiencias, empleando preparaciones de liposomas cuya carga neta fué variada tanto en signo / como en magnitud.

A este fin se utilizó, por una parte, dicetil fosfato (DCP) para dotar de carga negativa a los modelos, y por otra, estearilamina (EA) para obtener una carga neta positiva en aquellos. Estos componentes fueron incorporados en proporción creciente, hasta un máximo del 25 % (en moles) del total de lípido.

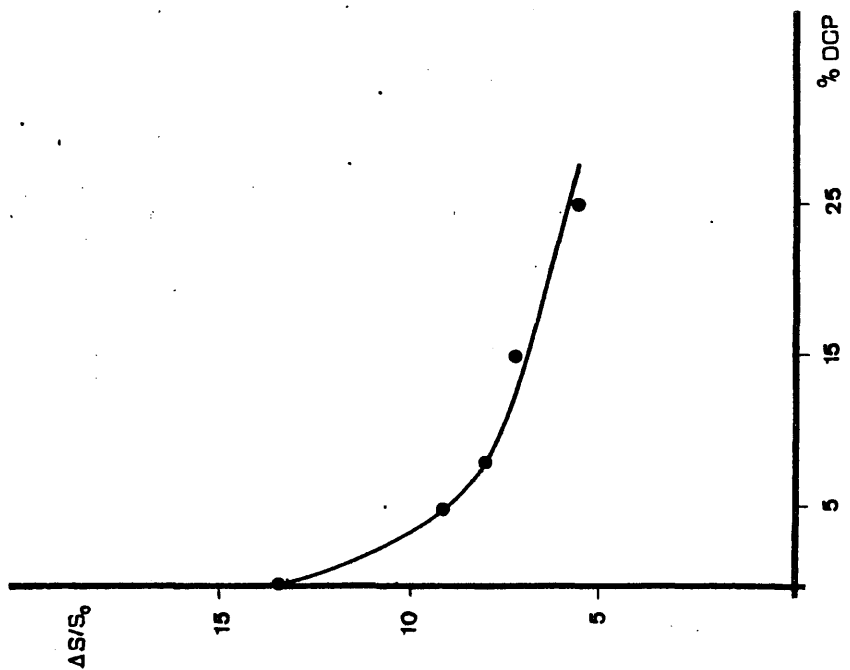
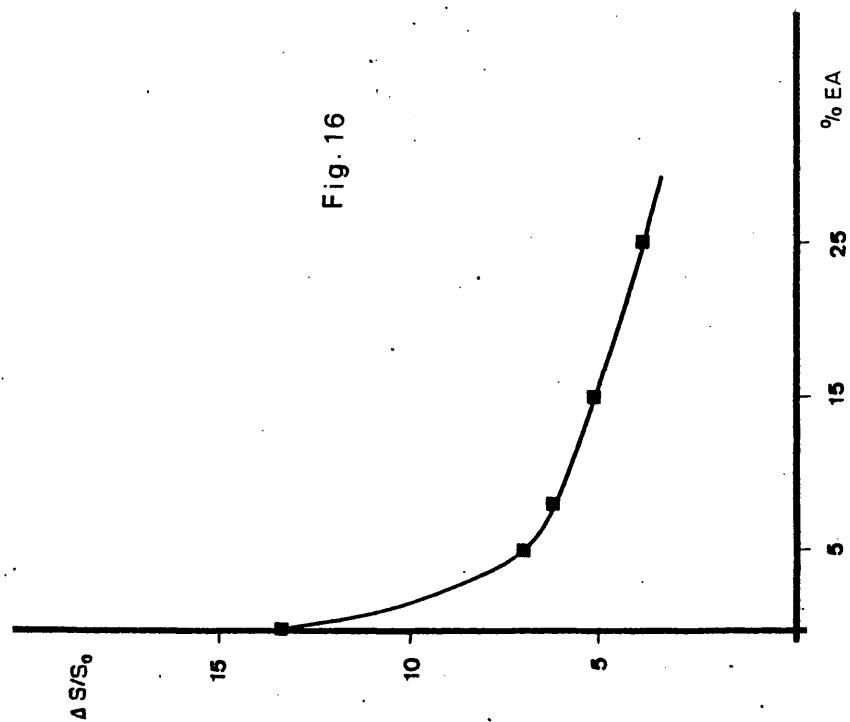
La preparación de las muestras, así como su / incubación y control de temperatura, se realizó siguiendo la misma pauta que en pruebas anteriores. Asimismo, el grado de interacción, fué estimado a través de las medidas de dispersión Rayleigh a 90° ($\lambda_{ex} = 500 \text{ nm}$).

Los resultados obtenidos, elaborados para su expresión final en forma de señal relativa ($\Delta S/S_0$) / quedan representados en la Fig. (16). El uso de esta / expresión, viene justificado como en otras ocasiones por el hecho de proceder los liposomas de preparaciones diferentes.

El descenso que se observa en la señal, al aumentar el tanto por ciento de componente cargado, confirma nuestra primera hipótesis.

El incremento en la repulsión electrostática entre los liposomas debido a su carga superficial, su-

Fig. 16



pone que la barrera energética a vencer en la primera / etapa de contacto, es mayor. Consecuentemente, las fuerzas que tienden a producir la adhesión intercelular, se ven menos favorecidas, y ello se traduce en que las estructuras de fusión, no llegan a alcanzar la extensión que en ausencia de carga neta.

Por otra parte, y en base a estos hechos, hemos de pensar que la naturaleza de la interacción liposomas - fitohemaglutinina, no es predominantemente electrostática — ver el apartado en que se estudia la influencia de los cationes — .

En todas nuestras experiencias, y como ya hemos hecho constar empleamos liposomas — de PC ó DPPC — según los casos — que, contienen un 8 % de DCP. Podría pensarse, qué razón existe para adoptar esta medida, — siendo como es, máxima la interacción, en ausencia de / este componente. La justificación se encuentra en el hecho comprobado, de que estos modelos, cuando no disponen de una carga neta en su superficie, tienden a adherirse fácilmente, perdiendo con ello el sistema en estabilidad. Esta, por el contrario, se ve reforzada por la existencia de una cierta carga, tal como la que produce la mencionada proporción de 8 % de DCP ó bien un 4 % de / ácido fosfatídico (P.A).

En adición, esto es razonablemente más correcto, si se tiene en cuenta que los modelos intentan ser una aproximación a las membranas naturales, y en ellas, existe, en general, una carga neta negativa. En concreto nos interesa el caso del eritrocito, al que ya hemos aludido al principio.

De un análisis algo más detenido de nuestros resultados, se desprende que la pendiente de la curva — debida a la E.A., es mayor que su equivalente con DCP. — Una explicación simple a esta diferencia, podría hallar

se en el pH del medio. Siendo el valor de este, de 5'45, es de esperar que el grado de ionización de la E.A sea mayor que el del DCP, y es evidente que las diferencias en la barrera energética intercelular que ello conlleva, puede justificar la ausencia de paralelismo en el descenso del grado de interacción.

Influencia de la temperatura

La influencia de la temperatura, sobre los / procesos de agregación celular inducidos por lectinas , ha sido siempre uno de los factores a tener en cuenta, en los estudios con dichas sustancias. La mayoría de las lectinas, presentan una reactividad prácticamente independiente de la temperatura, entre 4-40°C; a temperaturas superiores, suele producirse, en general, un desprendimiento de las moléculas de lectina de la superficie / celular. Es importante señalar, además, que lo que podríamos denominar " valencia " de la lectina, puede sufrir también modificaciones con la temperatura en virtud del equilibrio de agregación de subunidades de las moléculas de lectina, que es función de dicha variable (40, 186). Finalmente, recordemos que la fluidez de / la membrana, y en consecuencia la movilidad de los receptores, son conceptos estrechamente relacionados con el efecto de la temperatura.

Nuestro planteamiento, supone la investigación de la influencia de la temperatura, sobre la magnitud de la interacción, en cuanto a la información que / dicho estudio pudiera aportarnos, sobre la naturaleza de las fuerzas involucradas en el proceso. En principio, estas se nos presentan como esencialmente hidrofóbicas, es decir, a nivel de la matriz lipídica, ya que el efecto que se promueve, es una fusión de las estructuras vesiculares. Por otra parte, sería de esperar, una influencia positiva de la temperatura sobre la interacción, ya que al incrementarse la energía cinética de las partículas

las, aumenta el número de choques efectivos, y se contribuye a superar la barrera energética superficial, en la fase de contacto y agregación de aquellas.

Los ensayos fueron realizados, manteniendo / las soluciones madre de liposomas (92% PC + 8% DCP) y extracto, en incubación a cada temperatura, y procediendo, acto seguido, a provocar la interacción, incubando 15 min. a esa misma temperatura. Es decir, que, dentro del rango barrido — de 15°C a 55°C —, las muestras correspondientes a cada una de las temperaturas ensayadas, eran de preparación reciente, efectuándose la lectura / de la señal de dispersión de luz a 90°, inmediatamente después de transcurrido el periodo de incubación.

Los resultados obtenidos, expresados como ΔS , han sido representados gráficamente frente a la temperatura (Fig. 17). El empleo de la señal diferencial / (ΔS) como medida de la magnitud de la interacción, es adecuado, puesto que lleva ya implícita la corrección , para las alteraciones que pudieran deberse al cambio en el índice de refracción del medio, y de la bicapa con la temperatura.

El perfil que sigue esta representación, indica, que el aumento de la temperatura, de 15°C a 55°C, conduce a una disminución progresiva y prácticamente lineal del grado de interacción. En cualquier caso, y dado el margen de temperaturas que se abarca, esta variación no puede considerarse muy acusada. Este comportamiento, es congruente con el observado por Redwood y cols (156) para la WGA y la PHA, entre 4°C y 25°C, y asimismo, confirma los resultados de otros autores, respecto al comportamiento de las lectinas entre 4-40°C, a que nos hemos referido anteriormente.

En el análisis de las causas que intervienen en este descenso, que aunque poco pronunciado, se obser

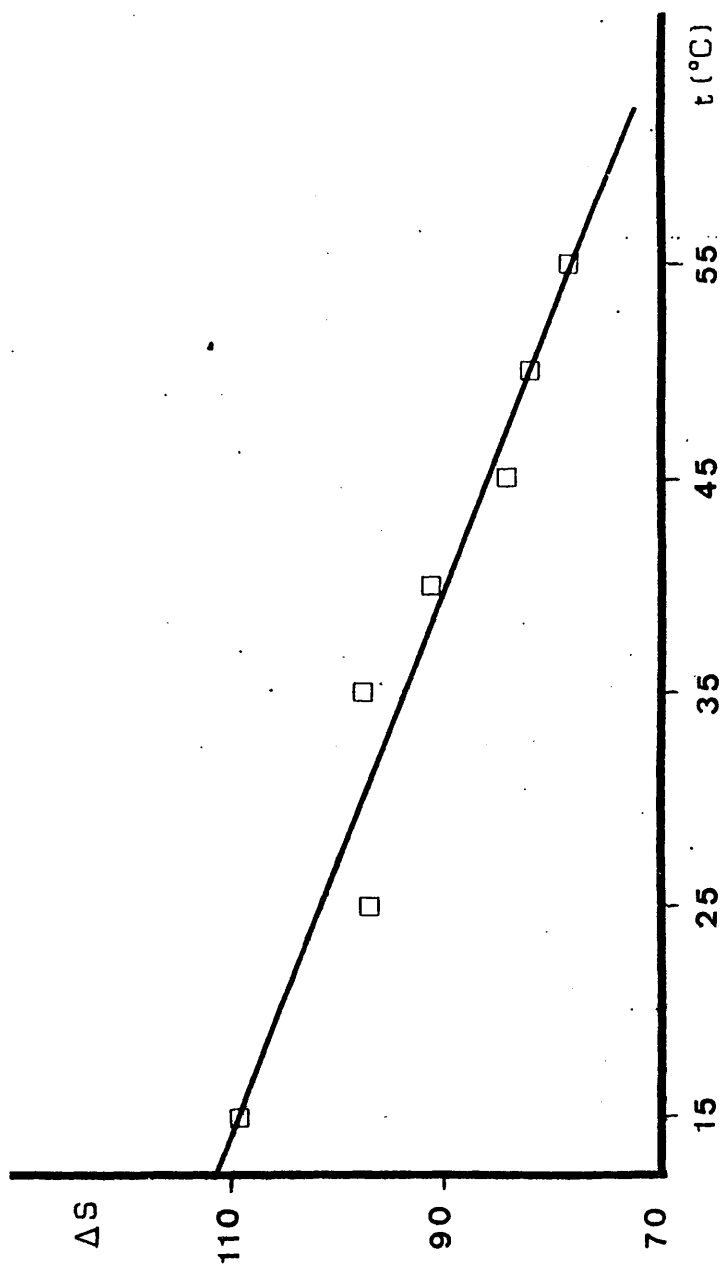


Fig.17

va en la magnitud de la interacción, no podemos olvidar la influencia, a que hemos aludido, de la temperatura / en el número de choques efectivos entre liposomas. En efecto, el aumento de temperatura, facilita la superación de la barrera energética, debida a la carga superficial de los modelos, y aumenta la efectividad en el choque. Esta influencia positiva de la temperatura sobre la interacción, en la primera etapa de contacto, puede ser responsable, al menos en parte, de que el descenso en la magnitud de aquella no sea más acusado.

Por otra parte, el resultado obtenido, refuerza a nuestro entender, la hipótesis de que la interacción fitohemaglutinina-liposomas, sea básicamente hidrofóbica. Las asociaciones que resultan de este tipo de / interacciones, en especial si sus integrantes poseen grupos polares con carga de igual signo, se estabilizan finalmente mediante fuerzas de corto alcance, en general fuerzas de dispersión de London. Así, aunque las interacciones hidrofóbicas se ven favorecidas, normalmente, por el incremento de temperatura (217), nos encontramos con que las fuerzas de estabilización, por su carácter de corto alcance, se ven afectadas en sentido / opuesto. Teniendo en cuenta además, que son también de este tipo las fuerzas involucradas en el proceso de fusión de las lamelas, su contribución negativa al aumentar la temperatura, explicaría un descenso en la magnitud de la interacción. No obstante, opinamos que la consecuencia final de la interacción a cada temperatura, y por consiguiente el perfil de la representación, depende esencialmente del balance de todos los efectos que / acabamos de mencionar, y que concurren con mayor ó menor preponderancia.

En los liposomas de PC-DCP con que hemos trabajado, la bicapa ofrece una matriz lipídica que se en-

cuentra en estado fluido en todo el rango de temperaturas que se ha abarcado. Hemos considerado que podía revestir particular interés, el comprobar a continuación, lo que sucede en un sistema susceptible de sufrir la / transición, de fase gel a cristal líquido, dentro del mismo rango de temperaturas. Para ello decidimos utilizar liposomas de composición: 92% DPPC + 8% DCP.

El método experimental seguido, fué en todo paralelo al empleado con los liposomas de PC-DCP. De la misma manera los resultados se expresaron como señal diferencial de dispersión de la luz (ΔS), y fueron llevados a una representación gráfica frente a la temperatura (Fig. 18). El trazado que se obtiene en este caso, es claramente distinto del anterior.

En primer lugar, no parece existir apenas variación de la magnitud de la interacción, entre 15°C y 35°C; simplemente se aprecia un ligero aumento entre 15°C y 25°C, poco significativo. La matriz lipídica, se halla en fase gel, en este intervalo de temperaturas. A partir de 35°C y hasta 45°C, es decir, el rango en que tiene lugar la transición de fase gel a cristal líquido, la señal ΔS , disminuye bruscamente. Por último, a temperaturas superiores a 45°C, la magnitud de la interacción parece experimentar un nuevo incremento.

Este trazado, particularmente en la zona de transición, resulta sorprendente a la vista de los datos aportados por diversos autores, respecto al comportamiento que presentan los liposomas de DPPC para ese mismo rango de temperaturas. Yi y cols (206), estudiando la dependencia con la temperatura de la señal de dispersión de luz a 45°, 90° y 135°, para dispersiones acuosas de DPPC, observan que la intensidad de dicha señal, sufre un brusco descenso a 41°C; asimismo, el índice de refracción de tales dispersiones, decrece a la misma /

160

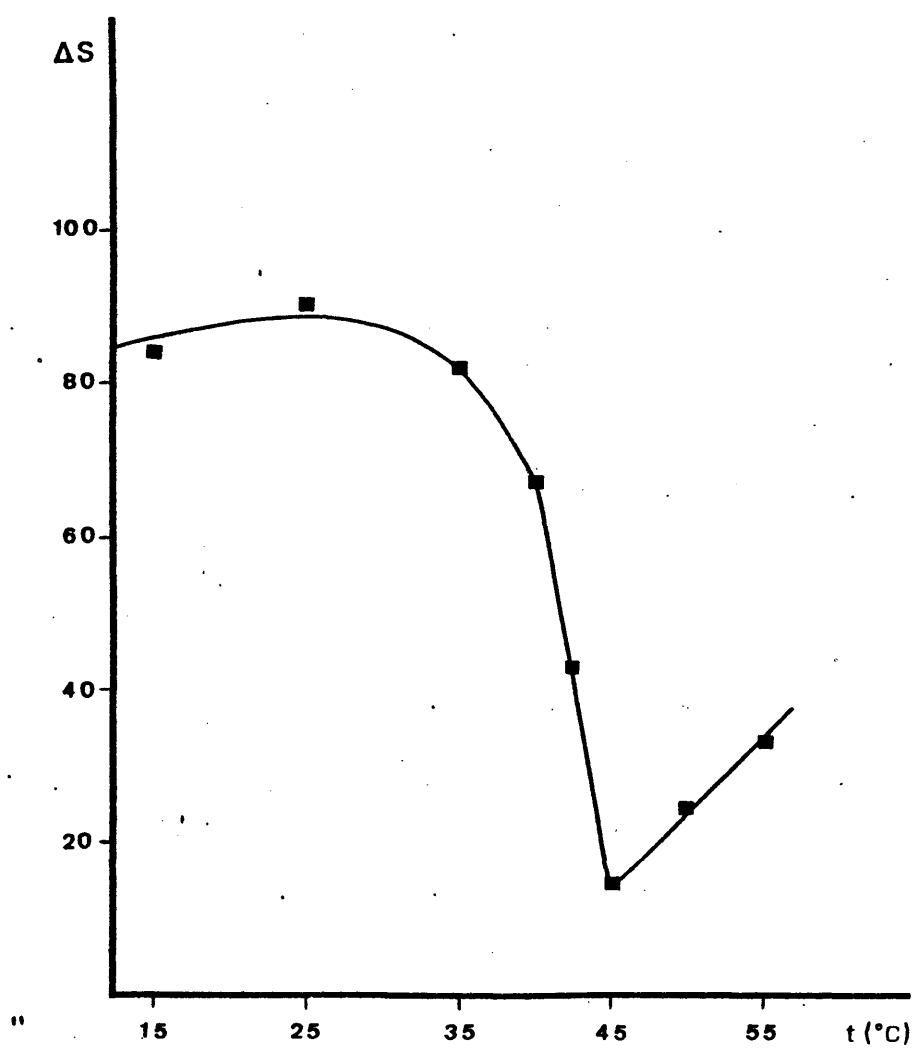


Fig. 18

temperatura, lo cual puede explicarse en virtud de la expansión que se produce en la bicapa lipídica, y la / consecuente disminución de su densidad. Por otra parte, llegan a estimar, que al menos una mitad del cambio en la intensidad de dispersión de la luz, es atribuible / al efecto de la temperatura sobre el índice de refracción; el resto, se debe aparentemente a un descenso en la anisotropía de la bicapa durante la transición de fase.

Chong y cols (207), utilizando liposomas / de idéntica composición, estudian la influencia del _ tiempo de sonicación y la filtración ó no de las dispersiones, sobre el tamaño de las estructuras; para / ello, emplea medidas de dispersión de la luz, y de turbidez, evaluando al tiempo su dependencia con la longitud de onda y la temperatura. En cuanto a este último factor, obtiene al igual que los primeros autores citados, un brusco descenso en la intensidad de la medida, que comienza a temperaturas algo inferiores a 40°C. En algunas muestras, de diferente preparación, el subsiguiente enfriamiento, muestra una histéresis notable, _ difuminándose en gran medida el cambio de intensidad durante la transición de fase. En otras muestras no / obstante, si bien se aprecia, con el aumento de la temperatura, un descenso en la señal, este no es tan marcado, y en el enfriamiento posterior, la dependencia / señal-temperatura, sigue el mismo trazado.

Para explicar estos comportamientos, los autores proponen la siguiente hipótesis: a 20°C y previo al primer ciclo de calentamiento, existen en la dispersión, agregados de vesículas de pequeño tamaño; por / efecto de la temperatura, y próximo a la transición de fase, se facilitan dos tipos de procesos. El primero _ de ellos, supone la ruptura de dichos agregados en ve-

sículas individuales, principalmente. El segundo, supone la fusión de las vesículas del agregado, formando / liposomas multilamelares de tamaño inferior. En ambos casos, la consecuencia inmediata es un descenso en la turbidez, ó en la señal de dispersión de luz, pero mientras en la primera situación puede volverse a un estado próximo al inicial mediante enfriamiento, en la segunda, el proceso es absolutamente irreversible. Esto explica el hecho de que en ciertas muestras, se aprecie una histéresis, y en otras no.

Otra de las aportaciones sobre este aspecto de la transición de fase, utilizando medidas de dispersión de la luz a 90° , se debe a Marsh y cols (208) . En su trabajo, estudian comparativamente el comportamiento de liposomas uni y multilamelares de DPPC , frente a la temperatura. De sus resultados, en concordancia con otros obtenidos por otras técnicas (209 - 211, 213) se desprende que la anchura de la transición, marcada por un descenso en la señal, es mayor para el sistema unilamelar, lo que se asocia con una disminución en la cooperatividad de la transición. Esta, está asimismo relacionada con un desplazamiento en T_c , de $2 - 5^\circ\text{C}$, respecto al sistema multilamelar, sugiriendo que una ligera disrupción en el empaquetamiento de las cadenas en estado gel, puede contribuir a dicho descenso.

Volviendo a nuestros resultados, y habida / cuenta de que su expresión como ΔS corrige las variaciones que pudieran haber sufrido los liposomas, y la correspondiente del índice de refracción — tanto de / la solución acuosa, como de la bicapa —, parece anormal que exista una disminución tan brusca de la interacción. Sin embargo, analizando independientemente la señal debida a la interacción, y la debida a los liposomas, encontramos que la primera (Tabla IX) experi-

Variación, con la temperatura, de la señal de dispersión de la luz, debida a la interacción de liposomas de DPPC con extracto de mirto.

t (°C)	S _I (1)	S _I (2)
15	90'7	90'7
25	97'7	88'7
35	95'7	82'7
40	78'5	75'5
45	38'5	49'5
50	43'2	57'2
55	50'2	58'2

(1) Muestra reciente ; (2) Muestra arrastrada

menta una reducción notable entre 40 y 45°C. Por su parte, la intensidad de dispersión de luz de los liposomas, se duplica en el mismo intervalo de temperaturas (Fig. 19). Por encima de 45°C, la interacción / crece de nuevo, mientras la señal de los liposomas sufre un suave descenso. La conjunción de estos efectos, puede justificar el trazado primitivo de AS frente a la temperatura.

El punto que llama nuestra atención es ahora el comportamiento peculiar de los liposomas al elevar la temperatura. En principio, el agudo incremento que se produce en la intensidad de dispersión de luz — en una zona donde por demás el índice de refracción de la solución acuosa y la bicapa disminuyen —, nos inclina a pensar que está teniendo lugar una fusión de las estructuras. Aunque esto pudiera parecer un proceso anormal según lo anteriormente expuesto, existen evidencias suficientes que justifican dicho comportamiento. Así, Abramson (212) observa que la composición salina del medio favorece frecuentemente la fusión. Marsh y cols (208) ponen también de manifiesto este efecto. Sheetz y cols (213), comprueban la dependencia de este proceso con la concentración salina, observando al igual que Abramson (212) que se ve favorecido por los fosfatos (PO_4^{3-}). El comportamiento de los liposomas en la transición de fase, es también dependiente del pH (212). Finalmente, otros autores (214) han demostrado que la presencia de ciertos ácidos grasos — como el ác. mirístico y el laurico — en la composición de las vesículas, facilita su fusión, en el intervalo próximo a T_c , desplazando incluso ésta última.

En cualquier caso, con respecto a nuestro problema, todo esto puede suponer, que al hallarse los liposomas fusionados, la superficie accesible a la aglu

165

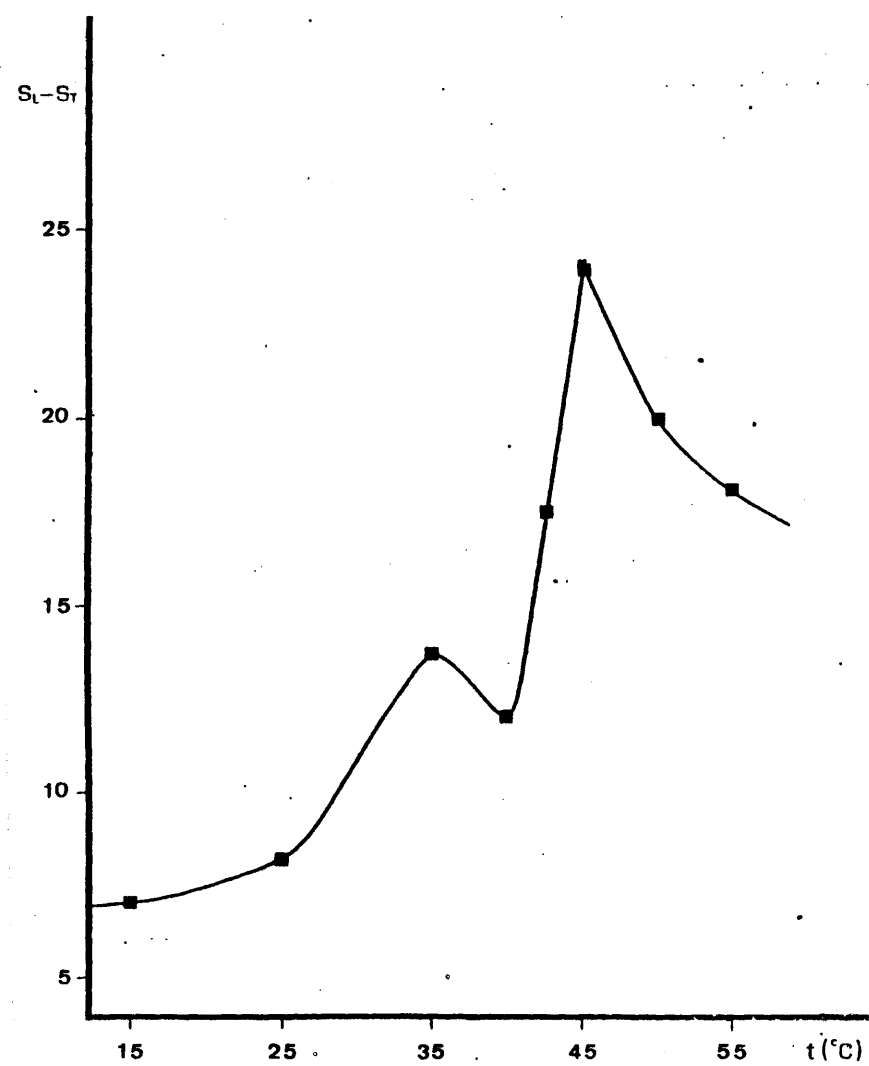


Fig. 19

tinina es comparativamente menor a lo largo de la transición, y en consecuencia, el grado de interacción disminuye.

Más allá de 45°C, la señal de dispersión de luz de los liposomas, desciende como cabía esperar de un comportamiento normal, indicando que los procesos / de fusión estimulados por la temperatura, han concluido. Por su parte, ΔS tiende a aumentar, y si se tiene en cuenta que en este rango, las variaciones que experimentan los índices de refracción del medio y de la / bicapa, juegan en sentido opuesto, la diferencia resulta aún mayor. Sin embargo, no puede atribuirse a un aumento real en la magnitud de la interacción, ya que habiendo provocado ésta a 15°C, y elevándose a continuación la temperatura de la muestra hasta 55°C, se obtiene idéntico resultado - Tabla (IX) -. Puesto que en este último caso, el proceso de fusión provocado por / la aglutinina ya había tenido lugar, y el mismo es irreversible, debemos pensar que el fenómeno observado, no depende de la interacción, sino que más bien refleja / alguna característica del comportamiento de la bicapa respecto de la dispersión de la luz.

Ante la posibilidad de investigar la influencía de la temperatura sobre la interacción y el posible efecto de ésta sobre la transición de fase en la etapa de enfriamiento, ó bien en un segundo calentamiento, _ como operan algunos autores, decidimos estudiar primeramente los procesos que tienen lugar en los liposomas tras sucesivos incrementos y descensos de temperatura.

Como se muestra en la Tabla X y en la Fig. _ (20), si bien durante el enfriamiento se obtiene un trazado distinto al primero, y ya similar al que predicen Abramson (212), Marsh (208) y Chong (207), en el segundo calentamiento se apreciaba una histéresis, in

Variación de la señal relativa de dispersión
de luz con la temperatura, en liposomas de DPPC

t (°C)	20'0	25'0	30'5	36'0	40'0	44'5	50'0	54'5
S.S.R.	1'32	1'32	1'28	1'29	1'59	2'02	1'93	1'89

1^{er} Calentamiento

t (°C)	—	25'2	29'6	35'0	40'0	44'0	48'5	54'5
S.S.R.	—	3'17	3'10	2'90	2'73	2'29	1'99	1'89

Enfriamiento

t (°C)	—	25'2	32'0	35'0	41'0	45'0	50'5	54'5
S.S.R.	—	3'17	3'11	3'00	2'95	2'70	2'43	2'31

2^a Calentamiento

T A B L A X

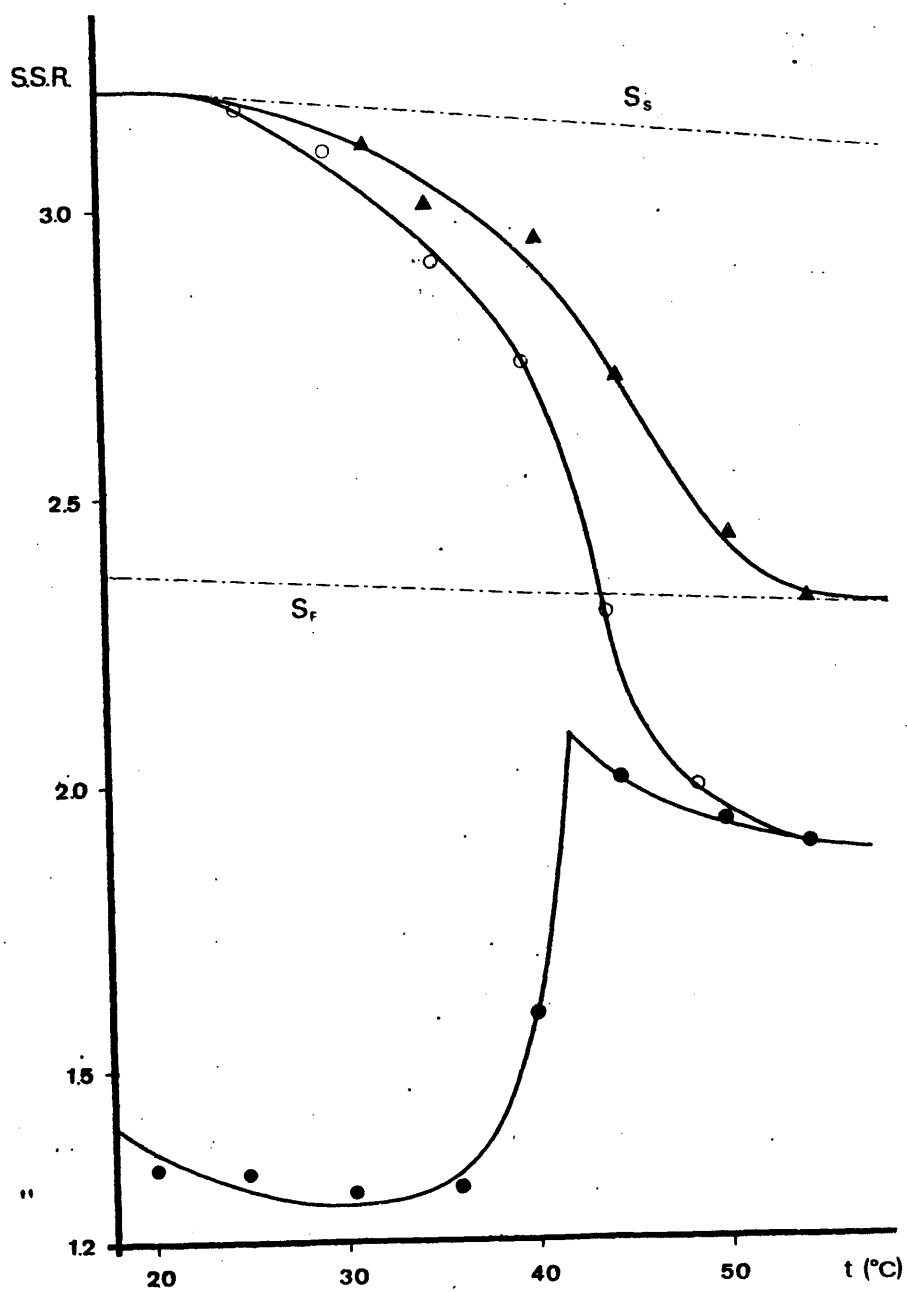


Fig. 20

dicando que hay una serie de cambios irreversibles. Este comportamiento no es del todo extraño, puesto que / en algunos casos (215], son necesarios hasta diez barridos de temperatura, para llegar a una estabilización de las estructuras vesiculares.

En cualquier caso, dado que el sentido que / sigue la señal de dispersión de luz es congruente con los datos aportados por Overath (216], consideramos interesante aplicar a los nuestros, el tratamiento que este autor propone para la estimación de la T_c y la anchura de la transición de fase (ΔT). Esta estimación , se realiza sobre la representación gráfica del parámetro θ , — que estos autores denominan grado de conversión, frente a la temperatura en °C, quedando definido dicho parámetro de la siguiente forma:

$$\theta = \frac{S_g - S}{S_g - S_f} ; \quad 0 \leq \theta \leq 1 \quad (3)$$

donde:

S : señal experimental de dispersión de la luz a 90° , a la temperatura T .

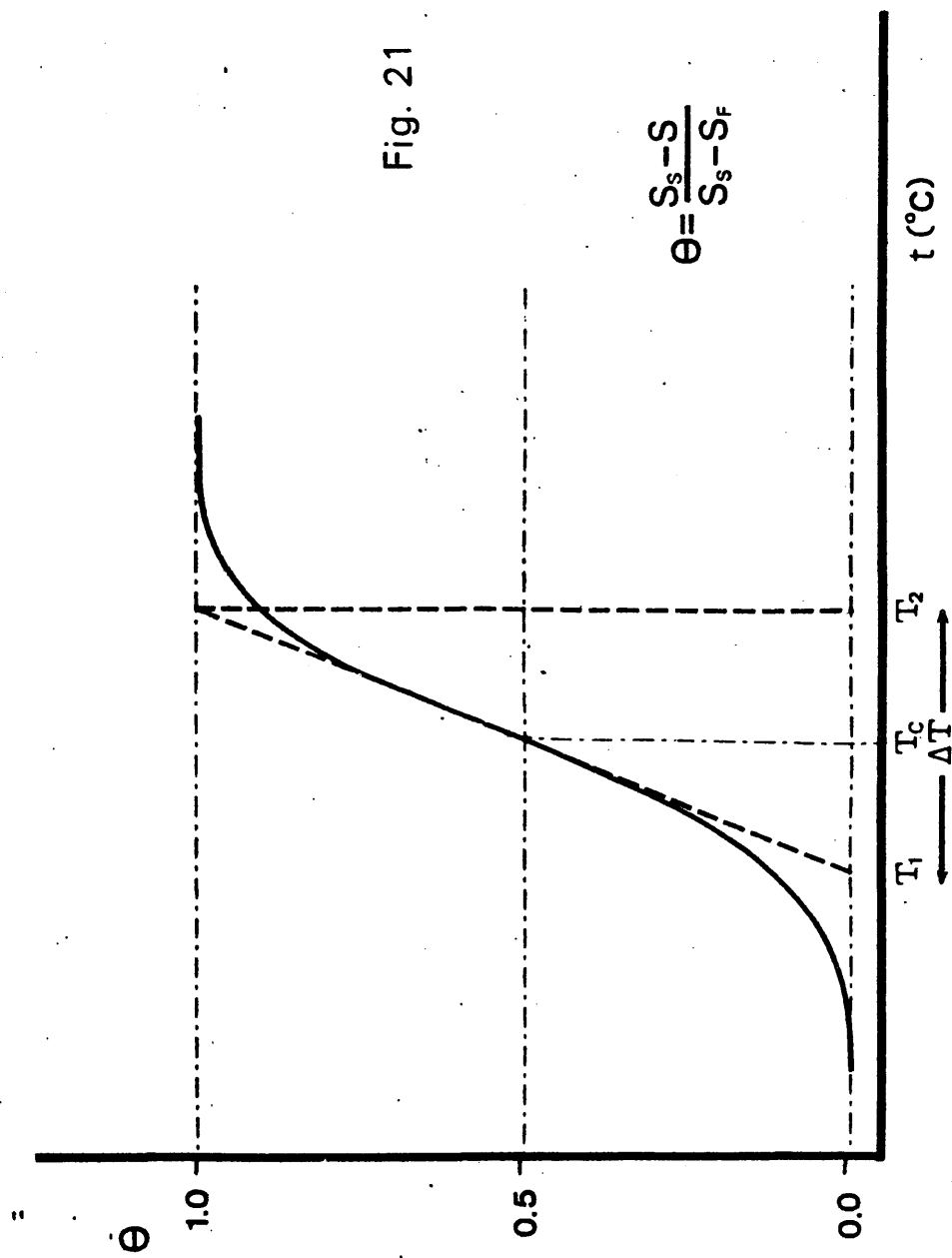
S_g : valor, a la temperatura T , de dicha señal, obtenido por extrapolación de los datos experimentales recogidos en la fase sólida.

S_f : idem, en la fase fluida.

En la Fig. (20), se muestra para la curva de enfriamiento, las líneas de extrapolación, sobre las / que se toman los valores de S_g y S_f a cada temperatura. Igualmente, en la Fig. (21) ofrecemos una representación tipo, de θ frente a t (°C), en la que asimismo

Fig. 21

$$\theta = \frac{S_s - S}{S_s - S_f}$$



se indica la forma de evaluar T_c y el intervalo de temperaturas (ΔT), para la transición de fase.

La elaboración de nuestros datos según este tratamiento, queda reflejada en las Tablas (XI, XII), y resumida en la Fig.(22), donde A corresponde al enfriamiento y B al segundo calentamiento. Como puede apreciarse, la anchura de transición de fase que se obtiene en ambos casos, es sorprendentemente grande, y en nuestra opinión, no debe tomarse en consideración. Por otra parte, este resultado concuerda con las observaciones / de Marsh y cols (208), según los cuales, la medida de la dispersión de la luz a 90° , especialmente en el caso de liposomas unilamelares, resulta poco fidedigna como indicador de la transición de fase, en virtud de la contaminación con estructuras multilamelares y debido a la sensibilidad de este método óptico al más pequeño proceso de fusión. Este último argumento, está en concordancia con la opinión de otros autores (206).

Nuestros resultados con liposomas de PC-DCP — Tabla XIII —, corroboran, a nuestro entender, la idea / de que la medida de la intensidad de dispersión de la luz, no resulta en absoluto conveniente, para estudios de transición de fase, y la influencia de elementos externos — como la fitohemaglutinina —, sobre la misma. En efecto, los sucesivos barridos de temperatura — calentamiento, enfriamiento y calentamiento — sobre una dispersión de liposomas de PC-DCP, conducen a la situación que presentamos en la Fig.(23). Como puede observarse, las curvas siguen un trazado bifásico, que se difumina, de forma progresiva, a través de los sucesivos barridos de temperatura, siendo en todos los casos, la discontinuidad en la señal, de orden notablemente / inferior a la obtenida con los liposomas de DPPC-DCP . En razón de esta pequeña discontinuidad, se explica el

Valores experimentales y extrapolados de la
dispersión de la luz, y del grado de conversión (θ),
en función de la temperatura (Enfriamiento)

t (°C)	S	S _S	S _F	θ
24	3'185	3'185	1'945	0
26	3'160	3'180	1'940	0'02
28	3'130	3'170	1'935	0'03
30	3'090	3'165	1'930	0'06
32	3'040	3'160	1'930	0'10
34	2'980	3'155	1'925	0'14
36	2'905	3'150	1'920	0'20
38	2'790	3'150	1'915	0'29
40	2'625	3'145	1'910	0'42
42	2'415	3'140	1'905	0'59
44	2'235	3'135	1'900	0'73
46	2'135	3'130	1'900	0'81
48	2'050	3'125	1'895	0'87
50	1'990	3'120	1'890	0'92
52	1'935	3'115	1'885	0'96
54	1'900	3'110	1'880	0'98
56	1'875	3'105	1'875	1

T A B L A XI

Valores experimentales y extrapolados de la
dispersión de la luz, y del grado de conversión (θ),
en función de la temperatura (2ª Calentamiento).

t (°C)	S	S _S	S _P	θ
24	3'185	3'185	2'355	0
26	3'165	3'180	2'350	0'02
28	3'150	3'170	2'345	0'02
30	3'130	3'165	2'340	0'04
32	3'100	3'160	2'335	0'07
34	3'070	3'155	2'330	0'10
36	3'020	3'150	2'325	0'16
38	2'970	3'150	2'320	0'22
40	2'910	3'145	2'315	0'28
42	2'840	3'140	2'310	0'36
44	2'740	3'135	2'305	0'48
46	2'630	3'130	2'300	0'60
48	2'530	3'125	2'295	0'72
50	2'450	3'120	2'290	0'81
52	2'380	3'115	2'285	0'89
54	2'320	3'110	2'280	0'95
56	2'285	3'105	2'275	0'99

T A B L A XII

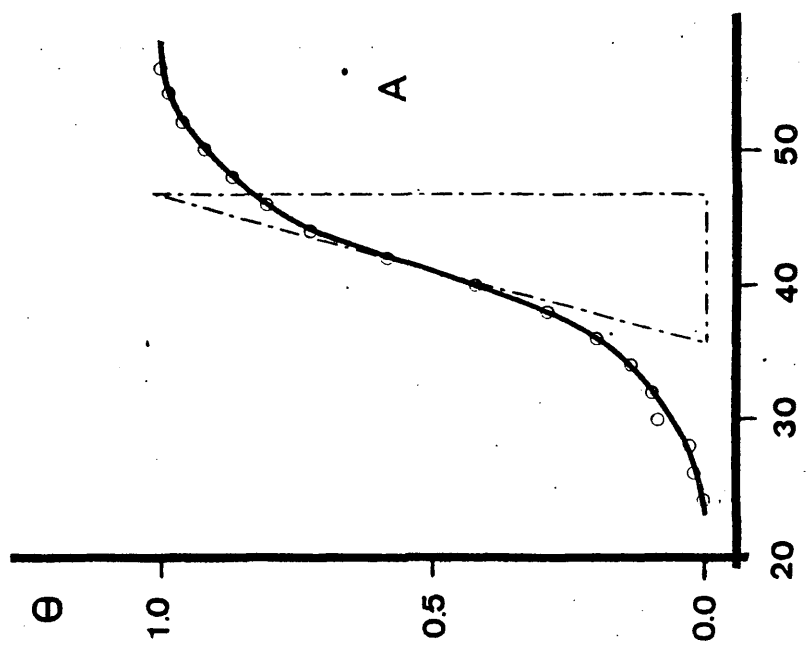
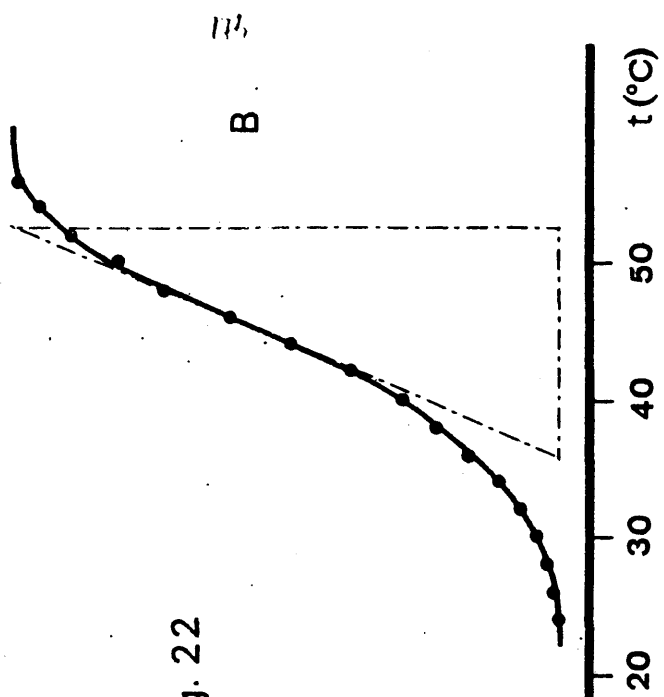


Fig. 22



Variación de la señal relativa de dispersión
de luz con la temperatura, en liposomas de PC

t (°C)	20'0	25'0	30'0	34'0	40'0	45'0	50'0	55'0
S.S.R.	1'12	1'09	1'09	1'04	0'96	0'93	0'92	0'93

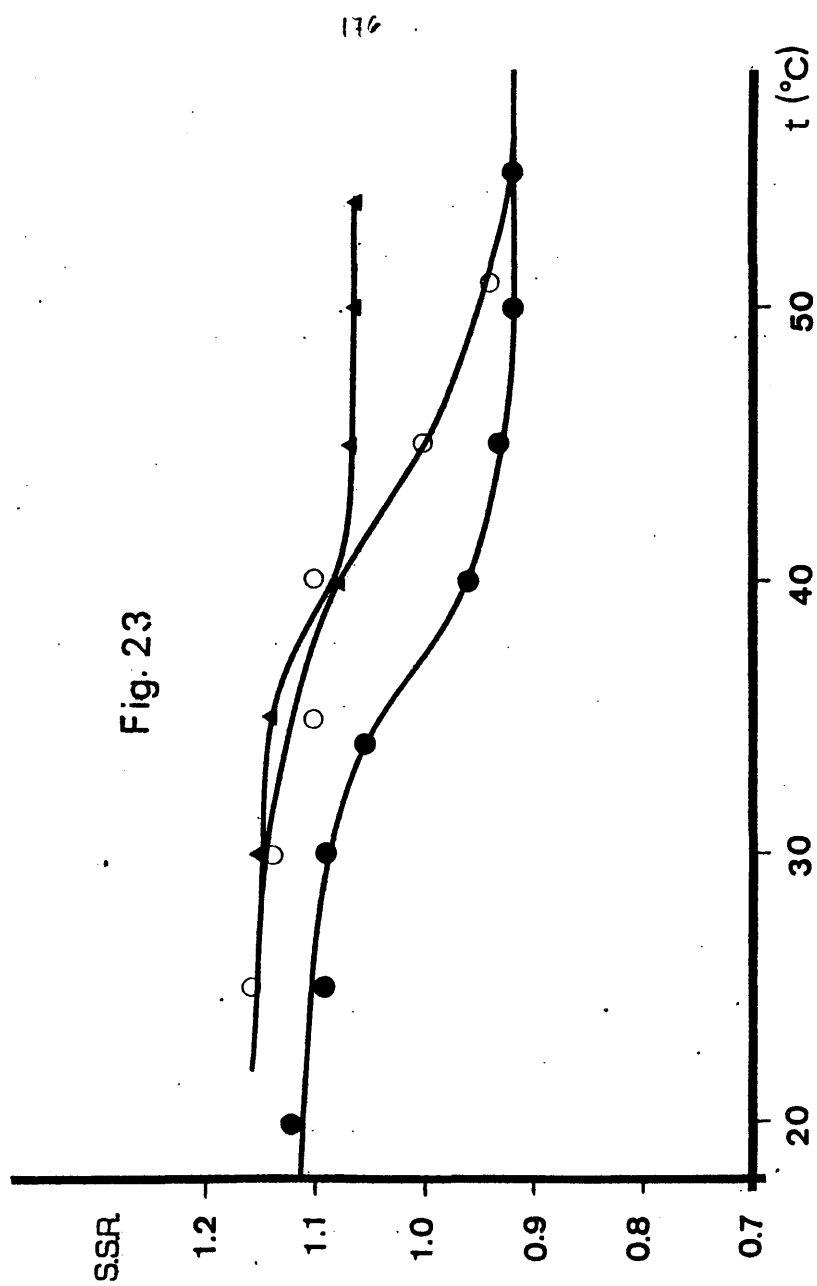
1^{er} Calentamiento

t (°C)	—	25'0	30'0	35'0	40'0	45'0	51'0	55'0
S.S.R.	—	1'16	1'14	1'10	1'10	1'00	0'94	0'93

Enfriamiento

t (°C)	—	25'0	30'0	35'0	40'0	45'0	50'0	54'0
S.S.R.	—	1'16	1'15	1'14	1'08	1'07	1'07	1'07

2^a Calentamiento



que según hemos podido comprobar, la dependencia de ΔS con la temperatura, para el sistema PC-DCP, no se vea significativamente afectada por este comportamiento de los liposomas. Habida cuenta de que en este sistema no existe transición de fase, en el rango de temperaturas con que se ha trabajado, parece lógico atribuir este / comportamiento (Fig.23), a un proceso de agregación ó fusión de carácter irreversible como el postulado por Chong y cols (207), y al que hemos aludido con anterioridad.

Por consiguiente, en nuestra opinión, de todo lo que acabamos de exponer se desprende, que la medida de ΔS — en cuanto a la complejidad de interpretación que lleva implícita —, no resulta adecuada para evaluar la influencia de la temperatura sobre la magnitud de la interacción liposomas-fito α hemaglutinina, en un sistema que es susceptible de sufrir transiciones / de fase. Ello no obstante, no invalida su uso en sistemas invariantes como queda demostrado en el caso de liposomas de PC.

Estudio de la influencia del extracto, sobre la
transición de fase de la DPPC, a través de medi-
das de fluorescencia.

Los sistemas fosfolípido-agua, tal que dispersiones, "black films", y monocapas en interfase aire-agua, ó solvente orgánico-agua, presentan transiciones termotrópicas de fase características (218, 219). Ello, ha conducido a numerosos investigadores, a estudiar tales transiciones empleando lípidos sintéticos (86, 220, 221). De sus resultados parece desprenderse que, por / debajo de la temperatura de transición — que es característica para cada lípido — las cadenas hidrocarbonadas, se hallan en la bicapa en conformación trans, organizadas en estrecho empaquetamiento hexagonal (87, 222). La transición, viene acompañada de una pérdida en el orden de las dos capas moleculares bidimensionales, un repentino incremento en la movilidad de las cadenas, una expansión lateral en el plano de la bicapa, un descenso en el espesor de la misma, y un incremento neto en el / volumen por molécula de lípido. Asimismo, existen también evidencias (223) de que por encima de la transición de fase, los grupos polares poseen mayor grado de libertad rotacional. El estado "fluido", favorece la difusión lateral de las moléculas de lípido en el plano de la bicapa (224).

Al ser la transición de fase un proceso altamente cooperativo, su aparición, requiere de la existen

cía de un elevado número de moléculas de lípido en una fase continua. El hecho de que se hayan observado transiciones de fase en membranas naturales, refuerza la hipótesis de que los fosfolípidos forman una fase continua con interacciones directas entre sus cadenas, es decir, una bicapa (225). Así por ejemplo, mediante DSC, difracción de rayos-X y turbidimetría, diversos autores (226-228) han detectado en membranas de *Acholeplasma laidlawii*, *Micrococcus lysodeicticus* y de mamíferos, estas transiciones térmicas. Es de hacer notar, que puesto que la composición de las membranas naturales es mayoritaria en lípidos cuyas cadenas hidrocarbonadas son insaturadas y se encuentran en conformación *cis*, las transiciones de fase, tienen lugar en general a temperaturas inferiores que en los modelos con lípidos sintéticos.

Las propiedades de los lípidos de membrana, pueden verse afectadas por los cambios estructurales / en la transición de fase, de tres maneras: 1) las variaciones de estructura de los grupos polares, puede incidir sobre la unión de ligandos a la superficie celular. 2) A nivel de las cadenas hidrocarbonadas pueden modificarse las interacciones entre los fosfolípidos, o entre éstos y otros constituyentes como el colesterol, proteínas, etc.. 3) De los dos efectos anteriores, puede preverse la variación en las características de permeabilidad de la membrana, por debajo y por encima de la temperatura de transición.

Por lo que respecta a nuestro problema, y a lo largo de los resultados que ya hemos expuesto, indicamos que la fitohemaglutinina del mirto, es capaz de penetrar la bicapa lipídica en alguna extensión, interaccionando con las cadenas. Si fuera así, el comportamiento de fase de los liposomas podría verse alterado.

A fin de conocer este posible efecto, y con ello aclarar nuestros supuestos, pensamos que, realizar un estudio, sobre liposomas de DPPC, podría aportarnos valiosa información.

Existen gran variedad de técnicas experimentales, mediante las cuales se han investigado las transiciones de fase, y las consecuencias que llevan aparejadas sobre la estructura de la bicapa lipídica. Haciendo un somero repaso, podemos citar trabajos de difracción de rayos-X (229) análisis térmico diferencial (86), dilatometría (220), espectroscopía Raman (230), RMN (221, 231), y dispersión de la luz a 90° (216). Sin embargo, dado que los lípidos no absorben la REM, ni presentan fluorescencia intrínseca, sólo algunas técnicas espectroscópicas como la difracción de rayos-X y la RMN, pueden utilizarse directamente. El principal problema en este campo, se centra en el descubrimiento de indicadores. La aplicación de ciertos métodos ópticos como la RSE y la fluorescencia se fundamenta en la incorporación de sondas en la bicapa, que informan sobre los acontecimientos que tienen lugar en ella; hoy día tales métodos, parecen revelarse como especialmente sensibles y completos, para el tipo de estudio que nos interesa.

Dichas sondas, han sido profusamente empleadas para los más diversos trabajos en torno al fenómeno de la transición de fase; tanto las de RSE (232) como las fluorescentes (216, 233). En cuanto a estas últimas, podrían ser clasificadas en 2 tipos: lipofílicas (perileno, DPH), y anfifílicas (ANS, NPN). Las primeras se caracterizan por variar su rendimiento cuántico en la transición de fase, mientras que en las segundas, — poco solubles en agua —, se produce al tiempo, un aumento en la incorporación a la bicapa. /

Evalutando estos cambios, y mediante medidas de su fluorescencia, se ha obtenido valiosa información acerca de la microviscosidad, ó fluidez, de la matriz lipídica (233), polaridad (234), potenciales de superficie (235) y estado energético de las bicapas de fosfolípido, así como de membranas biológicas (236).

Entre las sondas de carácter anfifílico, una de las más extensamente utilizadas, ha sido el 8-anilino 1-naftaleno sulfonato (ANS). Su rendimiento cuántico de la fluorescencia, aumenta extraordinariamente cuando se encuentra anclado en bicapas de fosfolípido. Como ya hemos comentado, este incremento está directamente relacionado con el estado físico de los fosfolípidos (216, 237). Diversos autores han estudiado el / equilibrio de unión de esta sonda a vesículas de lecitina (174, 238). Haynes ha observado que la reacción bimolecular de unión del ANS a la monocapa externa de vesículas de PC- huevo, tiene lugar en un tiempo aproximado de 100 μ s.

Overath y Trauble (216), Haynes y Staerk (238), Jacobson y Papahadjopoulos (174), han observado que el rendimiento cuántico de la fluorescencia (ϕ) del ANS es de 0'004 en agua, mientras que incorporado a bicapas de DPPC ó de DMPC (dimiristoil lecitina) alcanza valores de 0'08 y 0'29 respectivamente, llegando a hacerse próximo a la unidad en medios altamente apolares (234). Trauble y Overath (239) trabajando con membranas de E. coli, determinan transiciones de fase utilizando el ANS, y por comparación con / los valores de ϕ conocidos en metanol y etanol, determinan el valor de este parámetro en aquellas.

Este comportamiento que nos informa sobre la gran sensibilidad del ANS frente a la polaridad del medio, viene acompañado al tiempo de un desplazamiento

en al máximo de emisión fluorescente, concomitante con las variaciones de ϕ . Así, mientras que en solución acuosa dicho máximo se localiza a 515 nm, en dispersiones de DPPC ó de DMPC, aparece a 485 y 480 nm respectivamente.

Como ya es sabido, estos corrimientos espectrales, pueden relacionarse con la polaridad del microentorno de la sonda, mediante los valores de parámetro Z de Kosower (240, 241). Comparando la localización del máximo de emisión de la sonda en solventes con diferente valor de Z , se ha estimado que el ANS queda anclado en la bicapa, en una región cuya polaridad equivale a $Z = 83$. Este valor, es el que se obtiene para el metanol puro ó el etanol al 90% (241). El dato sugiere que el ANS no se incorpora en la región hidrofóbica de la bicapa, sino que más bien lo hace en la zona próxima a la superficie de las vesículas, donde los fosfolípidos presentan ciertas propiedades anfifílicas.

Por otra parte, el valor de $\phi = 0.08$, es característico para un entorno cuya constante dieléctrica sea alrededor de $\epsilon = 40$ (248). Teniendo en cuenta que la constante dieléctrica de la fase hidrocarbonada, se estima entre 2-4, de nuevo nos vemos abocados a aceptar que la sonda se ancla fundamentalmente a nivel de los grupos polares; concretamente (242), orientando su grupo sulfónico hacia la fase acuosa.

Aunque una de las mayores dificultades en la aplicación de esta sonda fluorescente en membranas, es su tendencia a interaccionar muy similarmente con lípidos y proteínas, su empleo en la detección de ciertas propiedades — como la transición de fase —, que dependen exclusivamente de los lípidos, resulta indudablemente ventajoso.

La adsorción del ANS sobre la superficie, de

pende considerablemente de la carga neta de la misma, y de la presencia de iones de carga opuesta que pudieran estar apantallando (223). Por tanto, los experimentos de titulación con ANS, demuestran que sólo se obtienen valores verdaderos de saturación, si la fuerza iónica del medio, es lo suficientemente alta como para apantallar la carga superficial. Trauble y Overath / (239) estudiando este aspecto sobre membranas de *E. coli*, con diferentes sales y a distintas concentraciones, concluyen que si la carga superficial es baja, o la fuerza iónica > 0.05 , la unión del ANS, está regida, en buena aproximación, por la ley de Langmuir.

Puesto, que nuestras experiencias iban encaminadas a determinar la influencia del extracto de mirto en la transición de fase de liposomas de DPPC, utilizando el ANS como sonda fluorescente, decidimos realizar unas pruebas previas sobre el sistema. En primer lugar, decidimos comprobar la dependencia que presenta la fluorescencia del ANS con la temperatura, en un medio de polaridad semejante a la de la región de la bicapa donde se localiza. Para ello, y para determinar la posible influencia del extracto sobre dicha dependencia, escogimos un medio formado por dioxano/ H_2O al 70%. Esta mezcla posee un valor del parámetro Z de Kosower (234, 241) igual al del metanol, y al del etanol 90%, que a su vez, como ya hemos mencionado, se consideran similares al del sitio de localización del ANS. La mezcla dioxano/ H_2O 70%, al tener un punto de ebullición superior a estos disolventes, y aunque las determinaciones se realizan en cubetas cerradas, supone una medida de seguridad en cuanto a las posibles evaporaciones, y sus consecuencias en la medida.

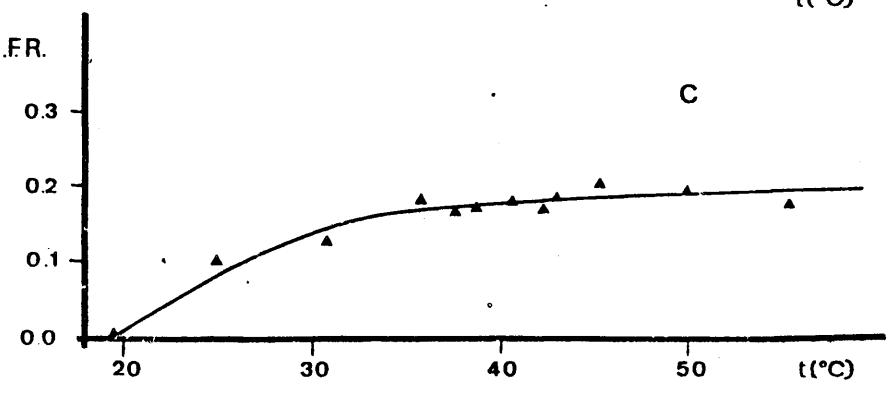
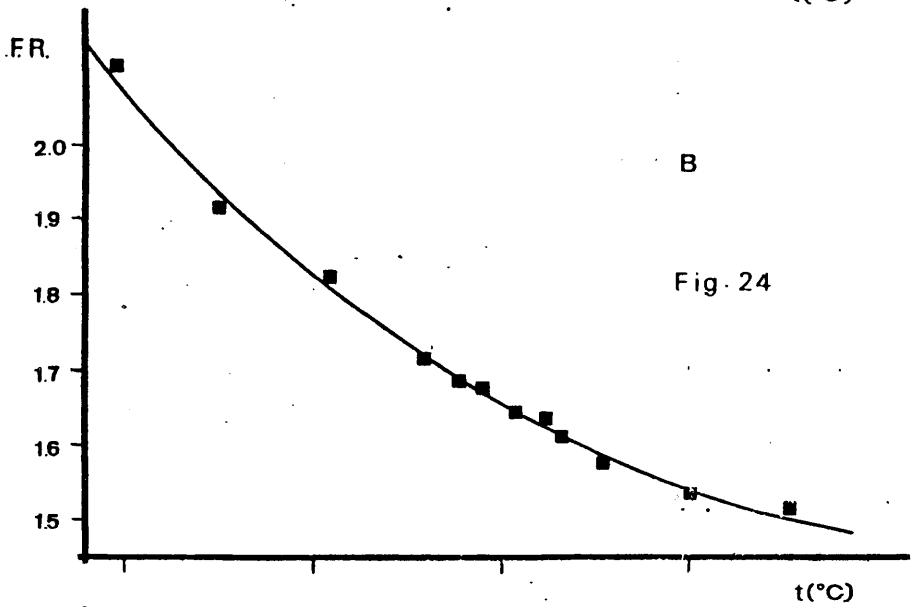
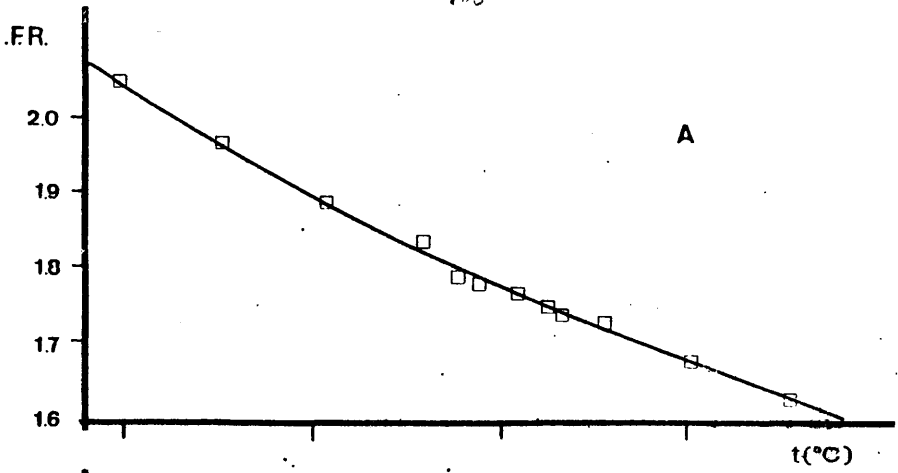
La concentración utilizada de ANS, fue de / $33\mu M$, lo que representa que nos encontramos por debajo

del límite de $2 \cdot 10^{-4}$ M que Trauble y Overath (239) / marcan para evitar fenómenos de distorsión en la estructura de la membrana. Con el fin de obtener valores relativos de intensidad de fluorescencia, se hizo uso de una solución de sulfato de Quinina 5 $\mu\text{g/ml}$ en SO_4H_2 / 0'1 N, a la que se sometió, paralelamente a cada muestra problema, a las variaciones de temperatura.

Los resultados obtenidos de señal de fluorescencia relativa (S.F.R.) fueron representados frente a la temperatura (Fig. 24). La gráfica A, corresponde a la S.F.R. del ANS simplemente; la B, a dicha señal en presencia de extracto — 6'2 $\mu\text{g/ml}$ —, y la C a la diferencia, a cada temperatura, entre ambos resultados. Los trazados reflejan una disminución de la S.F.R. del ANS tanto solo como con el extracto, siendo pequeña la modificación en este último caso, respecto al / primero. Concretamente (Fig. 24 C), a partir de 35°C la diferencia entre las S.F.R. se estabiliza.

El paso siguiente, fué comprobar el comportamiento de esta sonda en un sistema que no sufriera transición de fase, en el rango de temperaturas con que hemos trabajado. A este fin se utilizaron liposomas de PC (8% DCP) en tampón ác. cítrico/ PO_4HNa_2 pH= 5'45 . La incorporación del ANS se llevó a cabo — vease Materiales y Métodos — mediante inyección sobre la suspensión de liposomas ya diluida a 0'1 mg PL/ml. La longitud de onda de excitación, igual que en la experiencia anterior, fué de 380 nm, realizando la lectura en el / máximo de emisión (475 nm). En la Fig. (25) — Tabla XIV —, ofrecemos los resultados de S.F.R., representados frente a la temperatura, y que corresponden a 3 barridos — subida, bajada y subida de temperatura — . Según puede apreciarse, el trazado es coincidente en / los tres casos, e indica un descenso de la S.F.R. con

135



186

Variación de la señal de fluorescencia del
ANS con la temperatura, en liposomas de PC

t (°C)	20'0	25'0	30'0	35'5	39'5	45'5	49'0	55'0
S.F.R.	1'27	1'01	0'93	0'75	0'66	0'52	0'48	0'38

1^{er} Calentamiento

t (°C)	—	25'0	30'0	36'0	38'5	45'0	50'5	55'0
S.F.R.	—	1'08	0'91	0'74	0'68	0'54	0'43	0'38

Enfriamiento

t (°C)	—	25'0	32'0	36'0	41'0	45'0	50'0	54'0
S.F.R.	—	1'08	0'85	0'74	0'62	0'54	0'44	0'40

2^a Calentamiento

T A B L A XIV

184

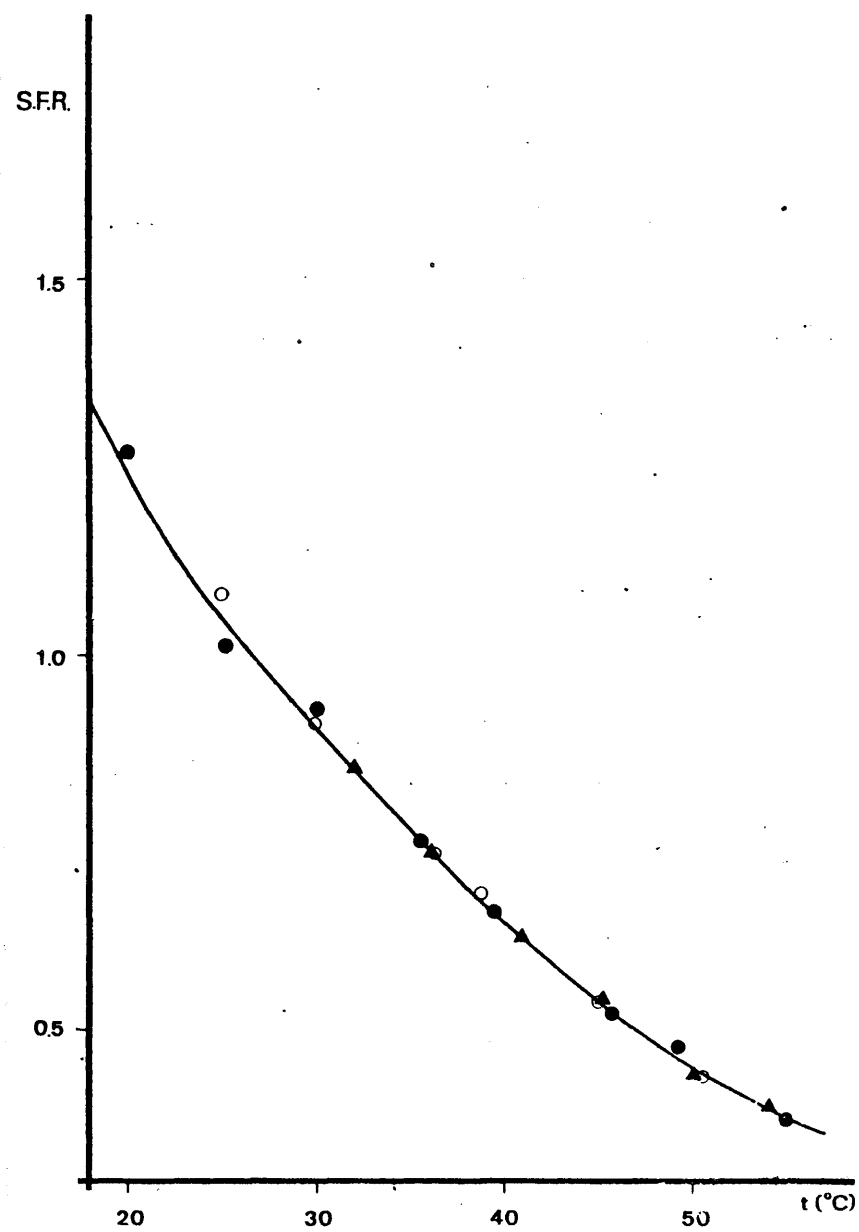


Fig. 25

la temperatura, no existiendo evidencia como era de esperar, de transición de fase. Esto supone que la dependencia del rendimiento cuántico de la fluorescencia / del ANS con la temperatura, no se altera a través de los sucesivos barridos.

Comparando este resultado con el obtenido en las medidas de dispersión de la luz a 90° para este mismo sistema, se puede comprobar que tanto el problema / de histéresis en los barridos de temperatura, como la discontinuidad en la señal — que pudiera confundirse con una transición termotrópica de fase —, se han eliminado. En consecuencia, consideramos adecuado realizar el estudio de la transición de la DPPC y sus posibles modificaciones por el extracto de mirto, con ayuda de esta sonda fluorescente.

El método experimental seguido con este sistema, fué idéntico en todo al caso anterior, difiriendo únicamente en que se realizaron sólo dos barridos / de temperatura: subida y bajada. Los resultados de S.F.R. obtenidos para los liposomas solos — Tabla XV —, y para su interacción con el extracto, — Tabla XVI — quedan representados en las Figs. (26) y (27) respectivamente. En ambas, se aprecia un característico y acusado incremento en la S.F.R., en la zona de temperaturas próxima a 40°C, durante el calentamiento. Dicho incremento, es concordante con el obtenido por Tsong / (243, 244) para esta misma sonda, con liposomas de DMPC. Según este autor, el transporte del ANS a través de la bicapa, se ve acelerado en la proximidad de la T_c por comparación al que se observa a temperaturas superiores ó inferiores a esta.

Numerosos estudios relacionados con procesos de membrana, concuerdan en la idea de que en la vecindad de la transición, se produce un incremento en la /

Variación de la señal de fluorescencia del ANS, con la temperatura,
en liposomas de DPPC

t (°C)	20'5	25'0	30'5	35'5	37'5	39'5	40'5	41'0	42'0	42'8	43'5	44'5	45'7	50'0	55'5
S.F.R.	1'89	1'72	1'56	1'10	1'10	1'14	1'19	1'30	1'51	1'62	1'73	1'71	1'68	1'49	1'23

Calentamiento

t (°C)	21'0	24'7	29'0	34'5	37'5	38'5	39'0	40'3	42'0	43'0	44'5	48'8	52'0	55'5	-
S.F.R.	1'27	1'18	1'11	1'20	1'29	1'34	1'47	1'65	1'81	1'86	1'85	1'56	1'42	1'23	-

Enfriamiento

T A B L A XV

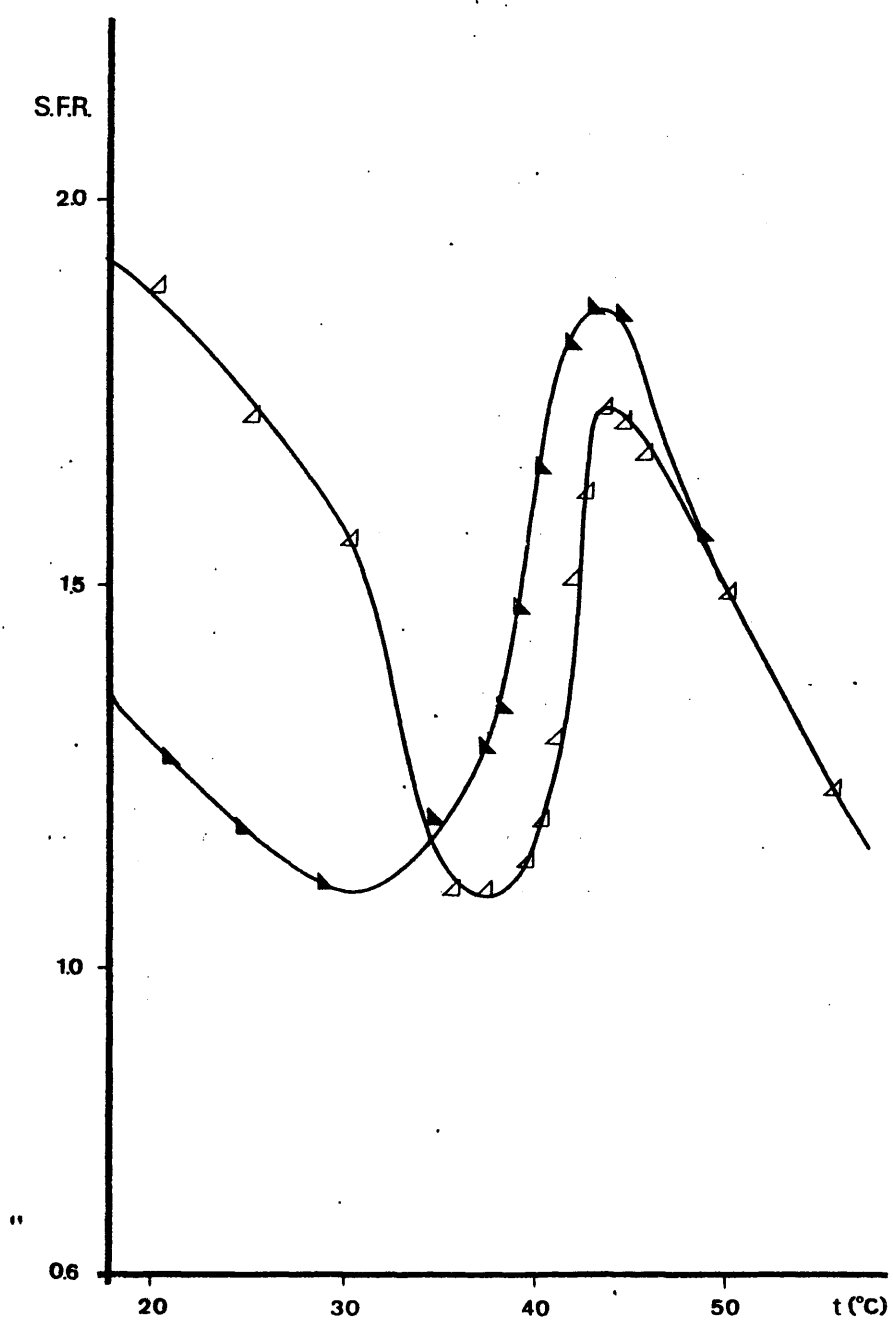


Fig. 26

Variación de la señal de fluorescencia del ANS, con la temperatura,
en liposomas de DPPC en presencia de extracto de mirto.

t (°C)	20'5	25'0	30'3	35'5	37'2	39'5	40'5	41'2	42'0	42'8	43'8	45'0	45'8	50'5	55'5
S.F.R.	1'09	0'94	0'81	0'75	0'78	0'84	0'99	1'15	1'32	1'41	1'44	1'46	1'41	1'18	1'04

Calentamiento

t (°C)	21'0	24'7	29'0	34'3	37'5	38'4	39'0	40'0	42'0	43'0	44'5	48'7	52'0	55'5	-
S.F.R.	0'75	0'71	0'68	0'70	0'92	1'08	1'25	1'42	1'53	1'57	1'56	1'33	1'15	1'04	-

Enfriamiento

T A B L A XVI

192

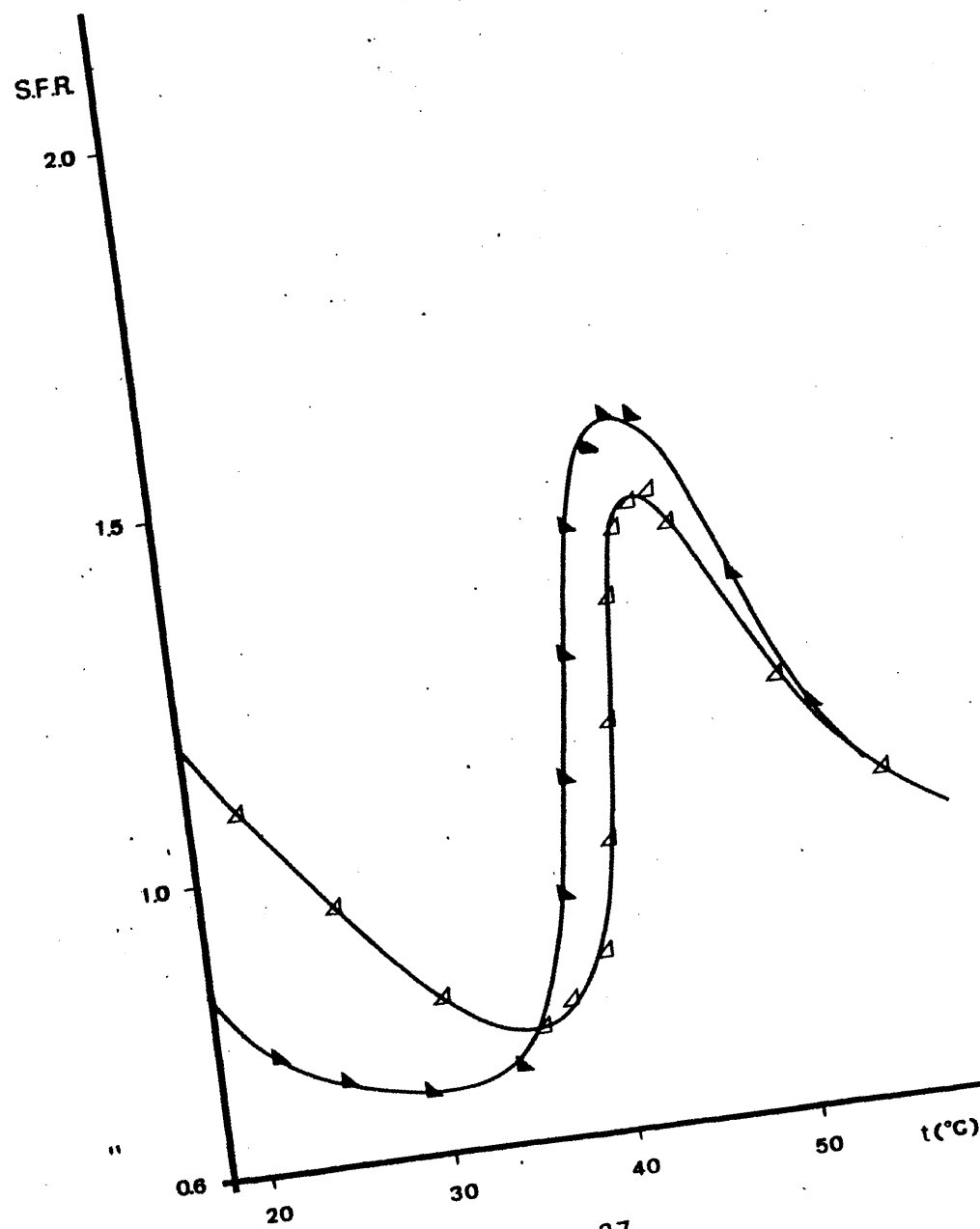
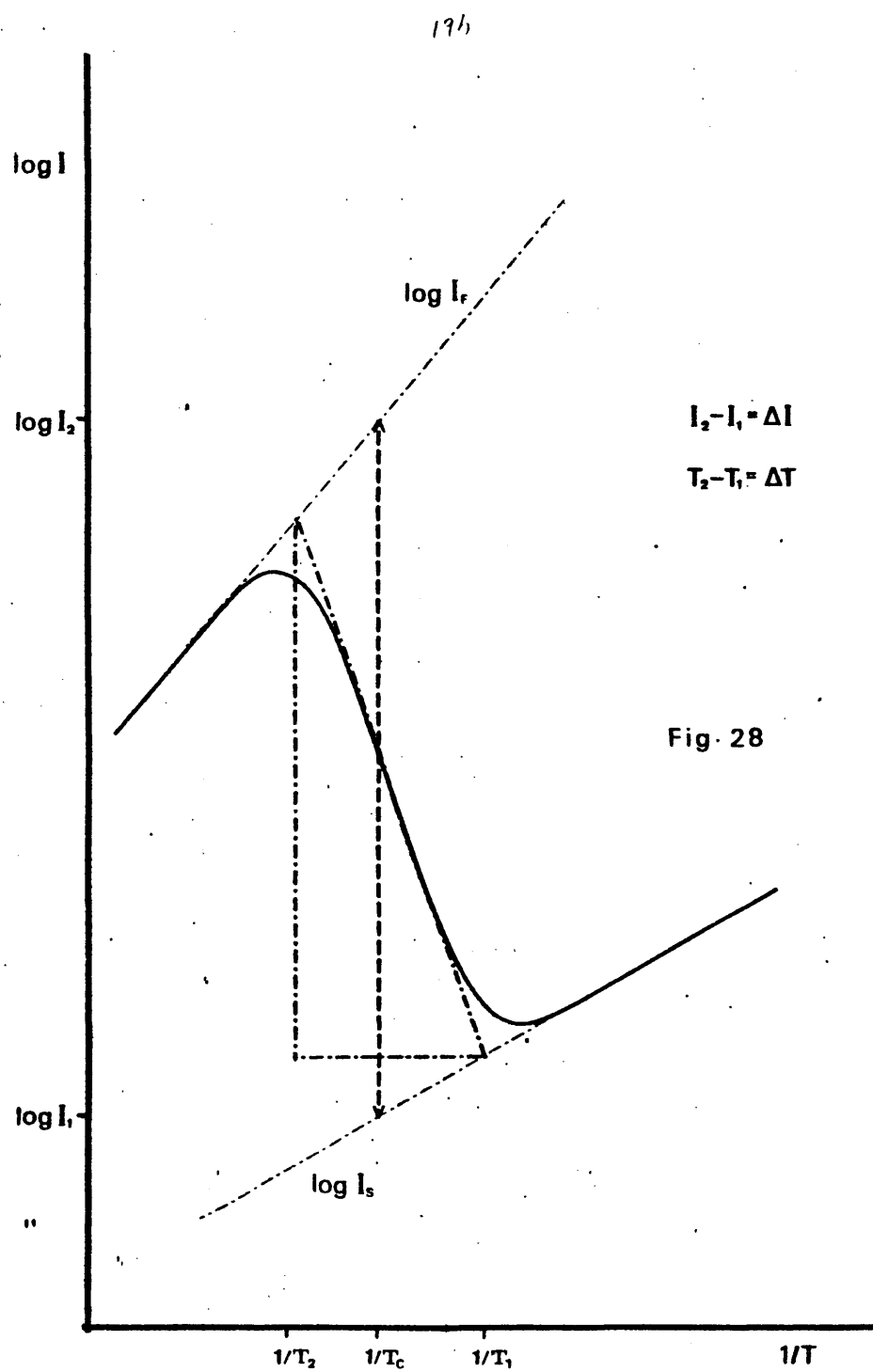


Fig. 27

cinética de los mismos. Así, en lo concerniente a fenómenos de transporte transmembrana, Papahadjopoulos y cols (245) observan un máximo en la permeabilidad del $^{22}\text{Na}^+$ en la T_c , tanto de vesículas de DPPC como de DMPC. La conductividad del K^+ mediada por la Valinomicina, se ve asimismo incrementada, y la penetración de moléculas exógenas en la bicapa, también. La hidrólisis de liposomas de DMPC por la fosfolipasa A_2 — de páncreas de cerdo —, se ve positivamente favorecida a la T_c , lo que es indicativo de que únicamente en ese momento tiene lugar una penetración significativa del enzima (246). Finalmente, Kantor y Prestegard (214), a quienes hemos aludido en los estudios de dispersión de la luz, concluyen que la fusión de vesículas de DMPC inducida por la presencia de ácidos grasos, sólo parece alcanzar una magnitud considerable cerca de la T_c .

Puesto que la influencia del extracto sobre la transición de gel a cristal-líquido debe ser estimada a través de la modificación de T_c , ΔT , etc..., consideramos oportuno aplicar a nuestros datos el tratamiento propuesto por Overath y Träuble (216) para la obtención de tales parámetros. El tratamiento consiste en la representación de los resultados experimentales en forma de $\log I$ ($\log \text{S.F.R.}$), frente a $1/T$. En la Fig. (28) ofrecemos una representación tipo, que como puede apreciarse, permite una extrapolación lineal por encima y por debajo de la transición de fase. La tangente al trazo central, en su intersección con ambas extrapolaciones, define $1/T_1$ y $1/T_2$, que corresponden al comienzo y al final de la transición, respectivamente. Asimismo, la paralela al eje de ordenadas en la que los puntos de intersección con las extrapolaciones equidistan del punto de coincidencia con la tangente antes mencionada, determina el valor de $1/T_c$. El pará-



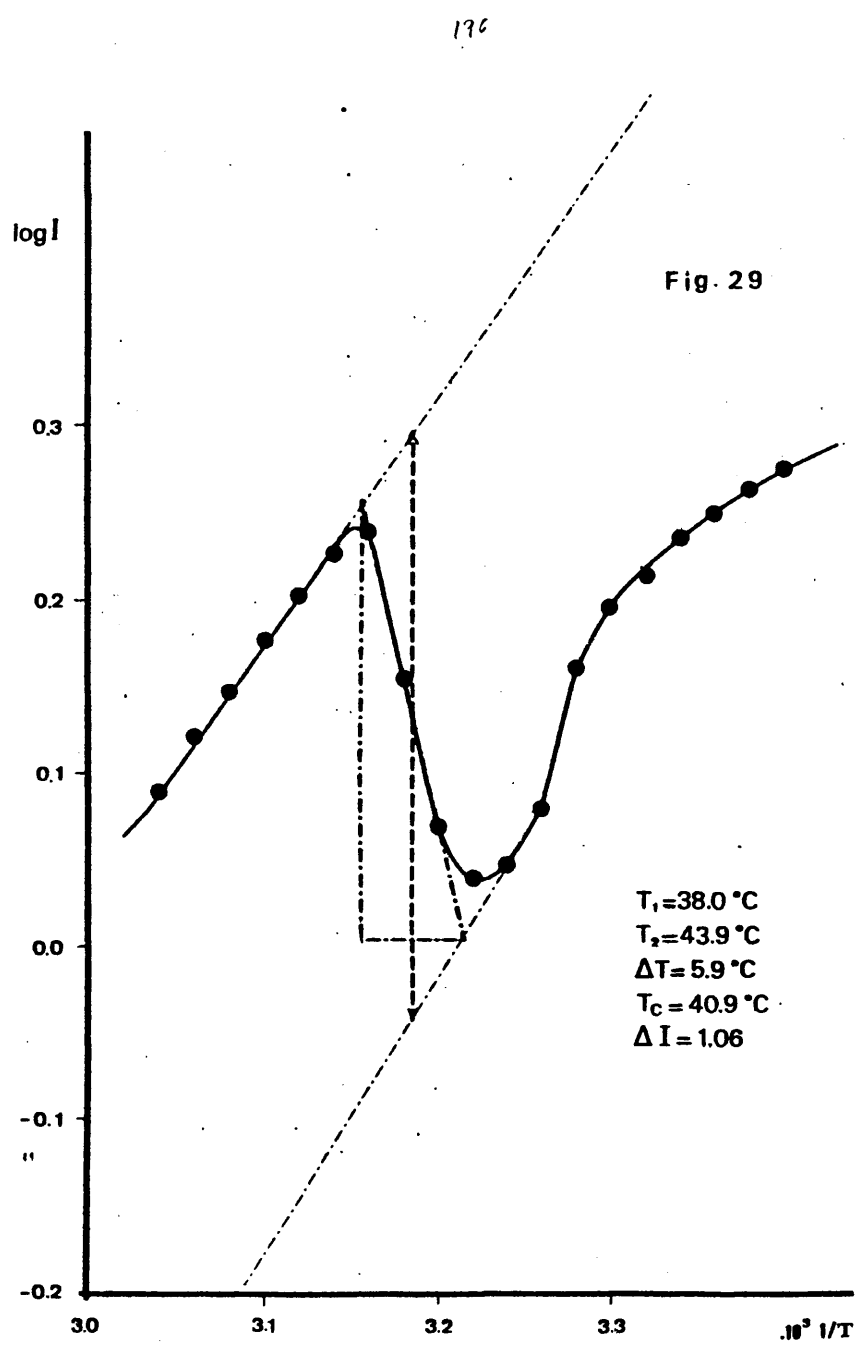
metro AI queda también definido por esta recta, según se especifica en la figura, y corresponde a la variación total de la S.F.R. del ANS, durante la transición de fase.

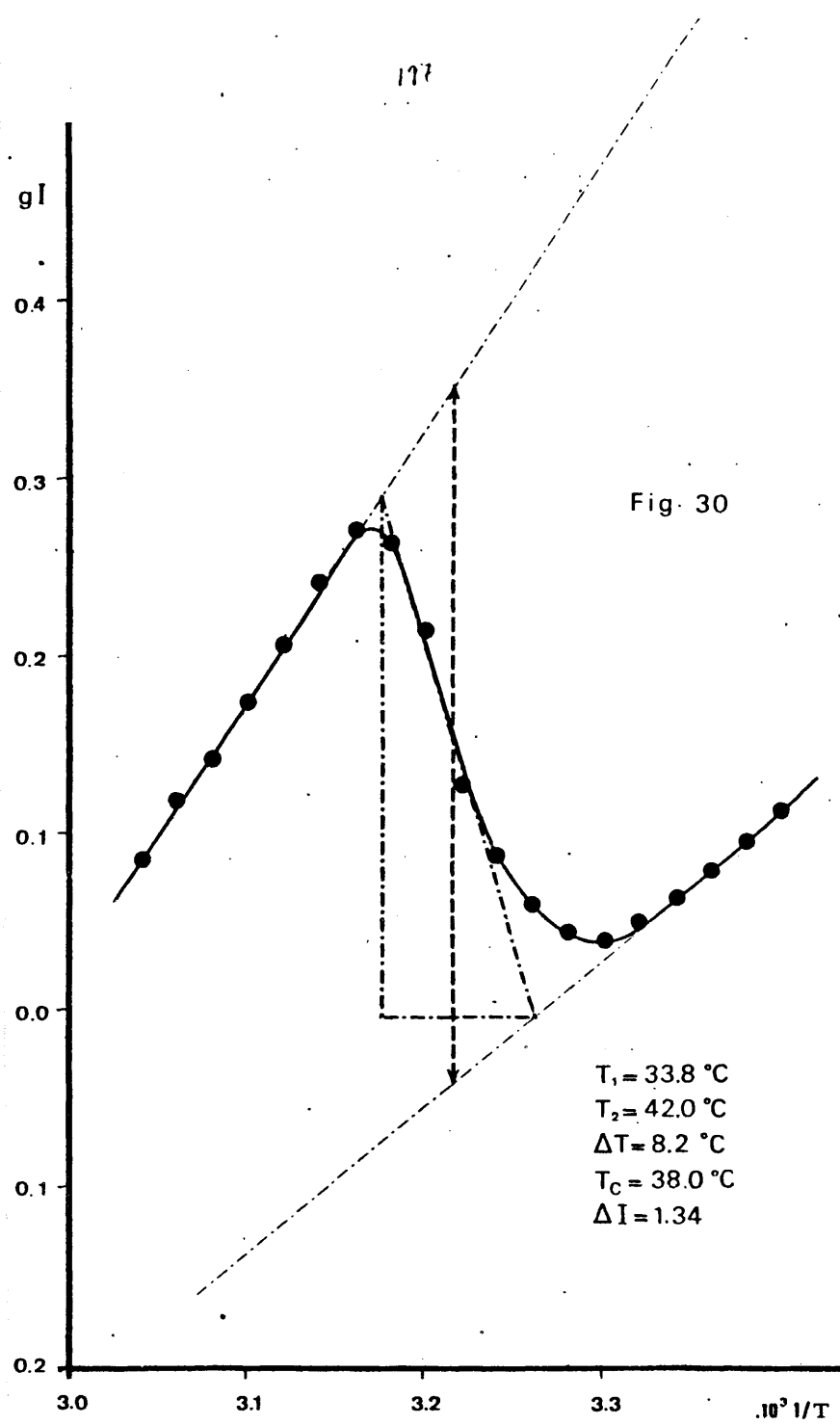
La aplicación de este tratamiento a nuestros resultados experimentales con liposomas, queda reflejado en las Figs. (29, 30) — subida y bajada de temperatura —, y las debidas a la interacción con el extracto en las Figs. (31, 32) — para subida y bajada de temperatura respectivamente —.

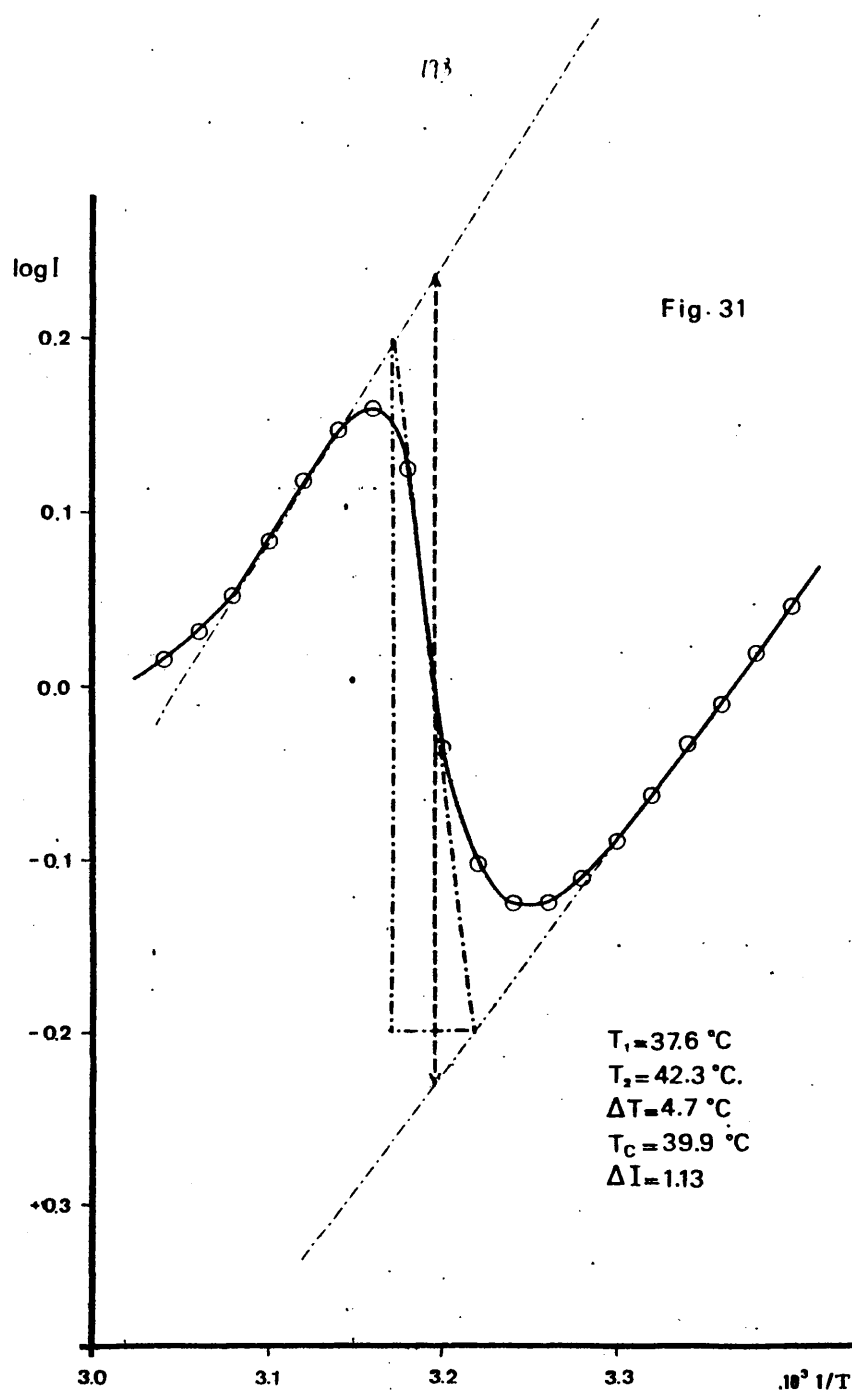
En la Fig. (33), se ofrecen los cuatro trazados juntos para facilitar su comparación.

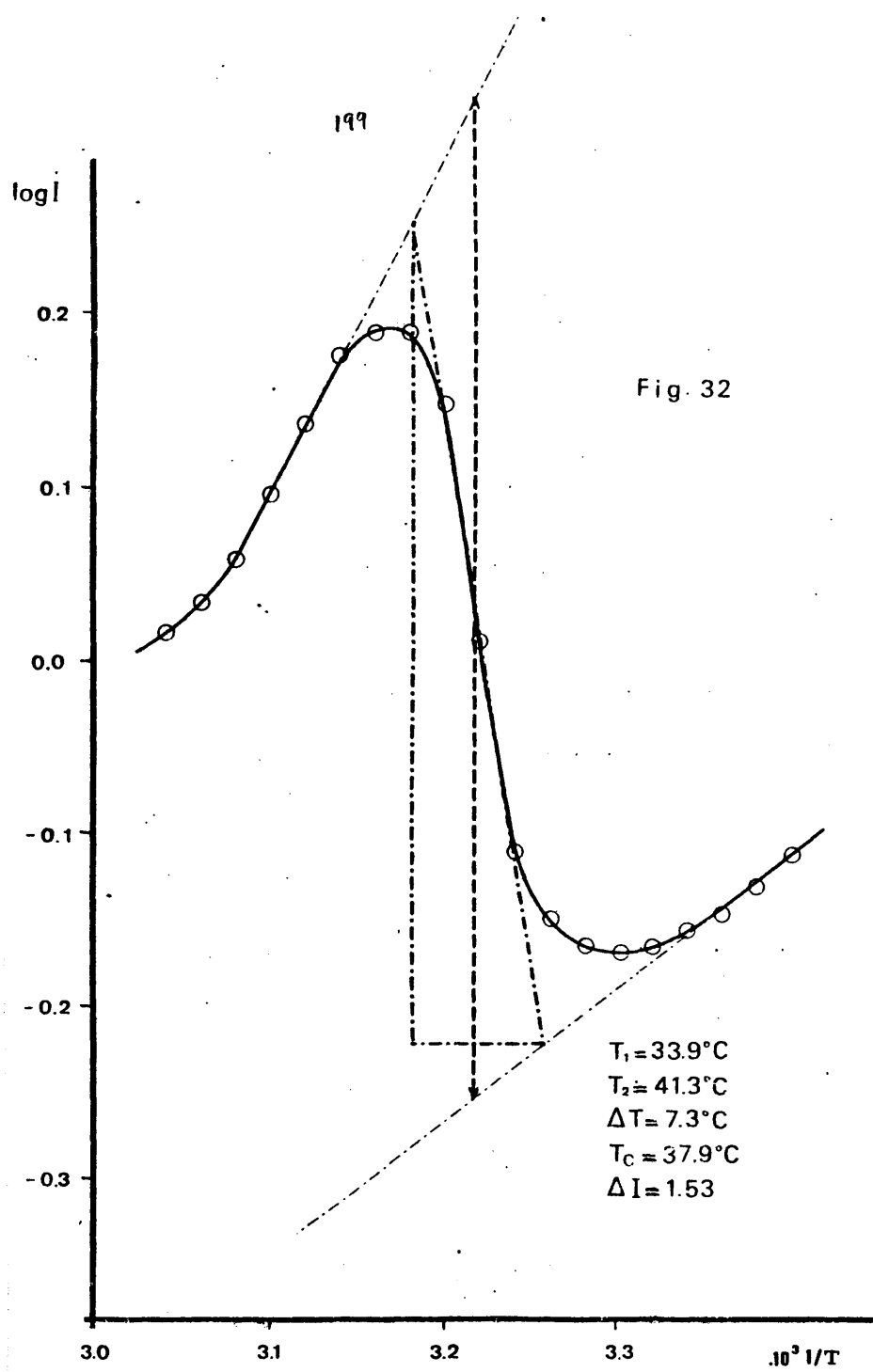
En este punto, conviene hacer una serie de / consideraciones respecto a la histéresis que se aprecia en la S.F.R. al descender la temperatura. Digamos ante todo, y en primer lugar que en base a los trabajos de Jacobson y Papahadjopoulos (174) se demuestra que la adición del ANS debe hacerse a temperaturas inferiores a la T_c si se pretende observar la transición a través del cambio brusco en la intensidad de fluorescencia de dicha sonda. Este incremento repentino al aumentar la temperatura, corresponde probablemente al transporte / del ANS hacia la capa interna del liposoma. Al disminuir la temperatura, el ANS es expulsado hacia el medio acuoso, es decir, por una parte las moléculas situadas en la capa externa hacia el medio intervesicular, y / las localizadas en la capa interna tras el transporte, lo son hacia la solución englobada en el liposoma. Esto implica que el número de moléculas de ANS ancladas, es ahora superior, por debajo de T_c , al que existía en el calentamiento. Ello explica la histéresis que se observa en el trazado de la curva de enfriamiento.

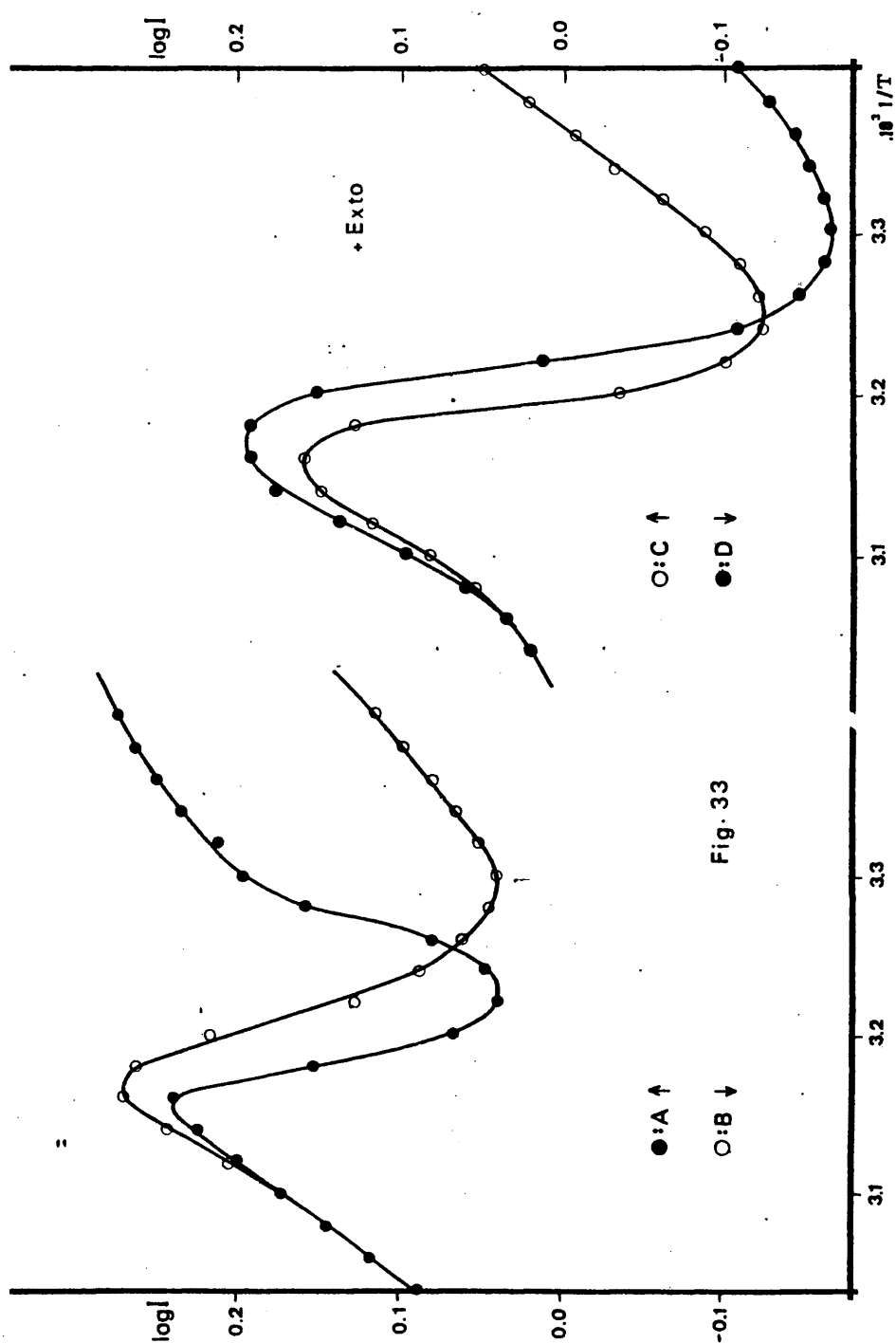
En el caso de la interacción, si bien tiene lugar una fusión de las estructuras, es aplicable el /











mismo razonamiento, con la única diferencia de que la expulsión del ANS al descender la temperatura, se produce hacia los espacios acuosos interlamelares.

Uno de los parámetros cuya modificación interesa estudiar, es la temperatura de comienzo de la transición. Aunque este término es relativo según nos referamos al calentamiento ó enfriamiento de la muestra, en nuestro caso, descartamos las curvas de enfriamiento, y nos referiremos en adelante al comienzo ó final de la transición, en el ascenso de temperatura.

Por estas razones, hemos resumido en la Tabla (XVII) los datos obtenidos mediante la representación de $\log I$ frente a $1/T$, al variar la temperatura / en dicho sentido. De los mismos se deduce, que la presencia del extracto, rebaja la T_c sólomente en 1°C , la T_1 en 0.4°C , y la T_2 en 1.5°C , de donde resulta que la modificación de ΔT , respecto a la que corresponde a los liposomas sólo, es de 1.2°C , lo que se debe esencialmente, a la disminución que opera sobre T_2 . Sin embargo, el extracto no altera ΔI . Trauble (223) ha demostrado, que ΔI para una concentración dada de ANS, es función fundamentalmente de la diferencia entre el número de sitios de unión en la fase " fluida " y la / fase " sólida ". En consecuencia, el extracto no altera dicha diferencia; sin embargo, la señal de fluorescencia del ANS en el sistema que contiene extracto, es menor que en ausencia del mismo. Esta diferencia en / nuestra opinión no es justificable por el pequeño efecto amortiguador ejercido por el extracto, por lo cual, este resultado, quizás refleje una competición por los sitios de unión que al producirse en igual extensión / en ambos lados de la bicapa deja inalterada la diferencia de la que según el mencionado autor, depende ΔI .

La localización de T_c es correcta, de acuer-

Valores de los parámetros T_1 , T_2 , ΔT y T_c , obtenidos según el tratamiento de Yguerabide (215) para liposomas de DPPC en el 1^{er} ciclo de temperatura

T_1	T_2	ΔT	T_c	
36'0	47'0	11'0	41'8	A
32'0	46'0	14'0	41'0	B

A: en ausencia de Extracto; B: en presencia de Extracto

T A B L A XX

Valores de los parámetros T_1 , T_2 , ΔT , T_c y ΔI obtenidos según el tratamiento de Overath y Trauble (216) para liposomas de DPPC, en el 1^{er} ciclo de temperatura.

T_1	T_2	ΔT	T_c	ΔI	
38'0	43'9	5'9	40'9	1'06	A
37'6	42'3	4'7	39'9	1'13	B

A: en ausencia de Extracto; B: en presencia de Extracto

T A B L A XVII

do con los datos aportados por otros autores (87, 247). No obstante, ΔT es aparentemente inferior al obtenido en estudios similares. Así, Jacobson y Papahadjopoulos, han comprobado en estudios de unión del ANS a liposomas de DPPC, que el intervalo de temperaturas en la transición de fase, es de 10°C aproximadamente, lo que significa un valor doble del que nuestras experiencias, a través del tratamiento de Overath y Träuble, arrojan.

A cualquier temperatura dentro de la transición de fase, en la bicapa coexisten regiones en estado cristal-líquido (" fluido "), y en estado gel (" sólido "). En estas condiciones, la representación de la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura, y la de Overath y Träuble es esencialmente esto, es suma de las contribuciones de las moléculas de sonda en cada una de las dos fases. De esta manera, quedan englobadas — además de la variación en la cantidad de bicapa en fase " fluida " y en fase " sólida " —, la variación del coeficiente de reparto (fluido/gel) de la sonda con la temperatura, y los cambios en ϕ_F y ϕ_S (rendimiento cuántico en fase fluida y en fase sólida respectivamente) con la temperatura. Este último factor, que podría distorsionar los resultados, se pone de manifiesto en las Figs. (30, 32), en las que se aprecia la falta de paralelismo entre las extrapolaciones — intensidad de fluorescencia en fase sólida (I_S) y fluida (I_F) —; / ello indica, que las dependencias de ϕ_S y ϕ_F con la temperatura, difieren.

Por estas razones, decidimos aplicar a nuestros datos, el criterio de Yguerabide (215), que se basa en las siguientes consideraciones. Para un sistema con un máximo de dos fases, la intensidad de fluorescencia a cualquier temperatura, — supuesto que la sonda ocupa en cada fase un único tipo de sitios, homogéneos—

-, viene dada por la expresión:

$$I = a \left[Q_S P_S + Q_F P_F \right] \quad (4)$$

que comparada con:

$$I = K \cdot \phi \cdot 2'3 \cdot \epsilon \cdot c \cdot l \cdot I_0 \quad (5)$$

donde $\epsilon \cdot c \cdot l \rightarrow 0$

podemos definir la constante "a" del instrumento, a una λ determinada, como: $a = K \cdot 2'3 \cdot I_0 \cdot l$. Por otra parte, Q_S y Q_F , representan el producto de la eficacia / cuántica (ϕ) y el coeficiente de extinción en fase sólida y fluida respectivamente. P_S y P_F , expresan el número de moléculas de sonda en cada una de las dos fases.

En general, Q_S , Q_F , P_S y P_F , dependen de la composición del sistema, y de la temperatura. Denominando P_0 al total de moléculas de sonda en la bicapa:

$$P_0 = P_S + P_F \quad (6)$$

y definiendo el coeficiente de reparto de la sonda como:

$$K = C_F / C_S \quad (7)$$

C_S : concentración de sonda en fase sólida

C_F : concentración de sonda en fase fluida.

dicho coeficiente, puede expresarse:

$$K = (P_F / P_S) (V_S / V_F) = \left[P_F / (P_0 - P_F) \right] (V_S / V_F)$$

(8)

donde V_S y V_F representan los volúmenes de ambas fases.

Resolviendo la ecuación (8) para P_F , sustituyendo en la (4), y reagrupando términos llegamos a una ecuación del tipo:

$$\bar{I} = y / (1+y) \quad (9)$$

en la que:

$$y = (V_F / V_S) K = P_F / P_S \quad (10)$$

Teniendo en cuenta que:

$$I_S = a Q_S P_0 \quad (11)$$

$$I_F = a Q_F P_0 \quad (12)$$

obtenemos una expresión final de \bar{I} :

$$\bar{I} = \frac{I - I_S}{I_F - I_S} ; \quad 0 \leq \bar{I} \leq 1 \quad (13)$$

I_S es la intensidad de fluorescencia que se / obtendría en la medida, si todas las moléculas de sonda se encontraran, a una temperatura, en fase sólida. I_F encierra el mismo concepto para la fase fluida. Finalmente, nos referiremos a \bar{I} como la intensidad de fluorescencia normalizada.

Volviendo a las consideraciones que se han / hecho en cuanto a los factores que engloba la variación de la señal de fluorescencia con la temperatura, y deteniéndonos en la ecuación (13), comprobamos que \bar{I} / es la parte de la intensidad de fluorescencia que refleja los cambios en N_S y N_F (número de moléculas de lípido en cada fase), y en K , con la temperatura; I_S e I_F , expresan la variación de I con la temperatura, en la parte que corresponde a los cambios sufridos por Q_S y Q_F con la temperatura y composición. Para mayor claridad, podemos escribir:

$$I = \bar{I} (I_F - I_S) + I_S \quad (14)$$

que muestra la dependencia de I con \bar{I} , I_S e I_F .

En las representaciones de \bar{I} vs T , se refleja la contribución del diagrama de fases, y el coeficiente de reparto K , a la forma de las equivalentes de I vs T , pero no se incluyen las posibles variaciones / de Q_S y Q_F con la temperatura y composición. Ambos tipos de representación, siguen el mismo trazado, cuando tanto Q_S como Q_F son independientes de los dos citados factores. En el caso de existir dependencia, su efecto sobre I , puede evaluarse a través de las representaciones de \bar{I} con la ec. (14).

Dentro de la región de transición de fase, / las extrapolaciones de la intensidad de fluorescencia, sobre las representaciones de I vs T — ó de la equivalente $\log I$ vs $1/T$ —, pueden emplearse para estimar la dependencia de I_F e I_S con la temperatura en dicha región. Existen varios métodos de extrapolación que / pueden utilizarse en base a las siguientes observaciones. Para muchos fluoróforos, según indican los estudios al respecto, la temperatura afecta principalmente

a la velocidad específica del proceso de conversión interna, pudiendo expresarse esta dependencia:

$$K_i = K_i^0 \exp (- E/RT) \quad (15)$$

donde E es la energía de activación, R la constante de los gases, y T la temperatura absoluta. De acuerdo con esta ecuación, la representación de K_i vs $1/T$ rinde / una línea recta, lo que justifica las extrapolaciones lineales de los datos de I vs T haciendo uso de la representación de $\log I$ vs $1/T$. Sin embargo, este método de extrapolación, no es absolutamente correcto, como vamos a demostrar. La intensidad de fluorescencia / debida a un fluoróforo en un entorno homogéneo, viene dada por:

$$I = I_0 \frac{K_e}{(K_e + K_i)} = \frac{I_0}{1 + (K_i^0 / K_e) \exp(- E/RT)}$$

(16)

donde K_e es la constante de velocidad para la emisión de radiación. Esta ecuación nos indica que en general las representaciones $\log I$ vs $1/T$ son complejas, no existiendo estricta linealidad salvo en el caso de que: $(K_i^0 / K_e) \exp(- E/RT) \gg 1$, y supuesto que K_e no depende de la temperatura. En tales condiciones, la ecuación (16) queda reducida a:

$$I = I_0 (K_e / K_i^0) \exp (E/RT) \quad (17)$$

Por otra parte, cuando $E/RT \ll 1$, podemos hacer una expansión en serie de $\exp (- E/RT)$ despreciando los términos de la misma a partir del segundo:

$$1/I = (1/I_0) \left[1 + (K_i^0 / K_e) (1 - E/RT) \right] \quad (18)$$

Estos cálculos indican, que el mejor método de extrapolación, depende en cada caso de los valores relativos de K_e , K_i y E . Consultando la bibliografía que concierne al tema, nos encontramos con que tanto / las representaciones de $\log I$ vs $1/T$, como de I vs $-1/T$, ó la más sencilla de I vs T , han sido utilizadas para extrapolaciones lineales, aunque normalmente, no se justifica el método.

En general, podemos decir, que para una sonda localizada en un medio homogéneo en el que P_0 es independiente de la temperatura, el método correcto / para la extrapolación, requiere la concordancia entre la ec. (16) y los datos experimentales.

Las consideraciones que acabamos de exponer, se refieren a sondas insolubles en medio acuoso (perileno, DPH); para aquellas débilmente solubles como el ANS, debe tenerse en cuenta que P_0 (número total de / moléculas de lípido accesibles a la sonda), varía con la temperatura y composición. No obstante, si se trata de evaluar el coeficiente de reparto de la sonda entre las fases sólida y fluida, a partir de las representaciones de I vs T , el método que hemos presentado puede utilizarse como una buena aproximación. La razón para ello se encuentra en el hecho de que tanto I_s como I_f no dependen exclusivamente de $Q = \phi.e$, sino de P_0 . Al _ extrapolar I_s e I_f en la región de la transición de fase, los valores extrapolados, incluyen a cada temperatura, la variación de P_0 . Los valores de \bar{I} calculados mediante la ec. (13), y los extrapolados de I_s e I_f / son por tanto aproximadamente independientes del repar

to de la sonda en el medio salino que rodea la bicapa.

Tras estas observaciones, pasamos a exponer los resultados obtenidos, elaborando nuestros datos experimentales en forma de \bar{I} . Los valores de I_s e I_f a cada temperatura, proceden de las extrapolaciones efectuadas en las correspondientes representaciones de $\log I$ vs $1/T$ (Fig 28). En las Tablas (XVIII, XIX) se presentan los datos de I_s , I_f , I e \bar{I} a cada temperatura, correspondientes al calentamiento, en ausencia y presencia de extracto respectivamente. Su representación gráfica frente a t ($^{\circ}\text{C}$), queda reflejada en la Fig.(34) — A sin extracto, B con extracto —. Sobre los trazados, se ha marcado el comienzo (T_1) y final (T_2) de la transición, siguiendo el criterio de Yguerabide (215).

Por último la Tabla (XX) resume los resultados de T_1 , T_2 , T_c e ΔT en presencia y ausencia de extracto. De su análisis, observamos en primer lugar, y para los liposomas sólo, que los valores de T_1 y T_2 son muy similares a los obtenidos por Jacobson y Papahadjopoulos (174). En segundo término, la $T_c=41.8^{\circ}\text{C}$, se encuentra en excelente acuerdo con los datos de DSC (86) que arrojan un valor de $(41.5 \pm 0.3)^{\circ}\text{C}$. Finalmente, ΔT es también muy semejante al dato aportado por Jacobson y Papahadjopoulos (174).

En lo concerniente a la influencia del extracto de mirto sobre estos parámetros, la T_c se ve poco modificada, sólo un descenso de 0.8°C . La anchura de la transición se incrementa en 3°C , debido a las variaciones de T_1 y T_2 . Así, mientras esta última sólo descende en 1°C , la temperatura de comienzo de la transición (T_1) se ve rebajada en 4°C .

De acuerdo con este análisis, nuestra opinión es que el extracto está introduciendo una ampliación /

Valores experimentales y extrapolados de la
S.F.R. y del parámetro \bar{I} (S.F. normalizada), en
función de la temperatura, en ausencia de extracto .

t (°C)	I	I _S	I _F	\bar{I}
36	1'11	1'11	2'36	0
38	1'09	1'03	2'21	0'05
40	1'17	0'95	2'07	0'24
42	1'43	0'89	1'93	0'52
44	1'73	0'82	1'81	0'92
46	1'68	0'77	1'70	0'98

T A B L A XVIII

Valores experimentales y extrapolados de la
S.F.R. y del parámetro \bar{I} (S.F. normalizada) en
función de la temperatura, en presencia de extracto .

t (°C)	I	I _S	I _F	\bar{I}
32	0'77	0'77	2'34	0
34	0'75	0'72	2'18	0'02
36	0'75	0'68	2'02	0'05
38	0'79	0'63	1'88	0'13
40	0'92	0'60	1'75	0'28
42	1'34	0'56	1'62	0'74
44	1'45	0'53	1'51	0'94
46	1'41	0'49	1'40	1'01

T A B L A XIX

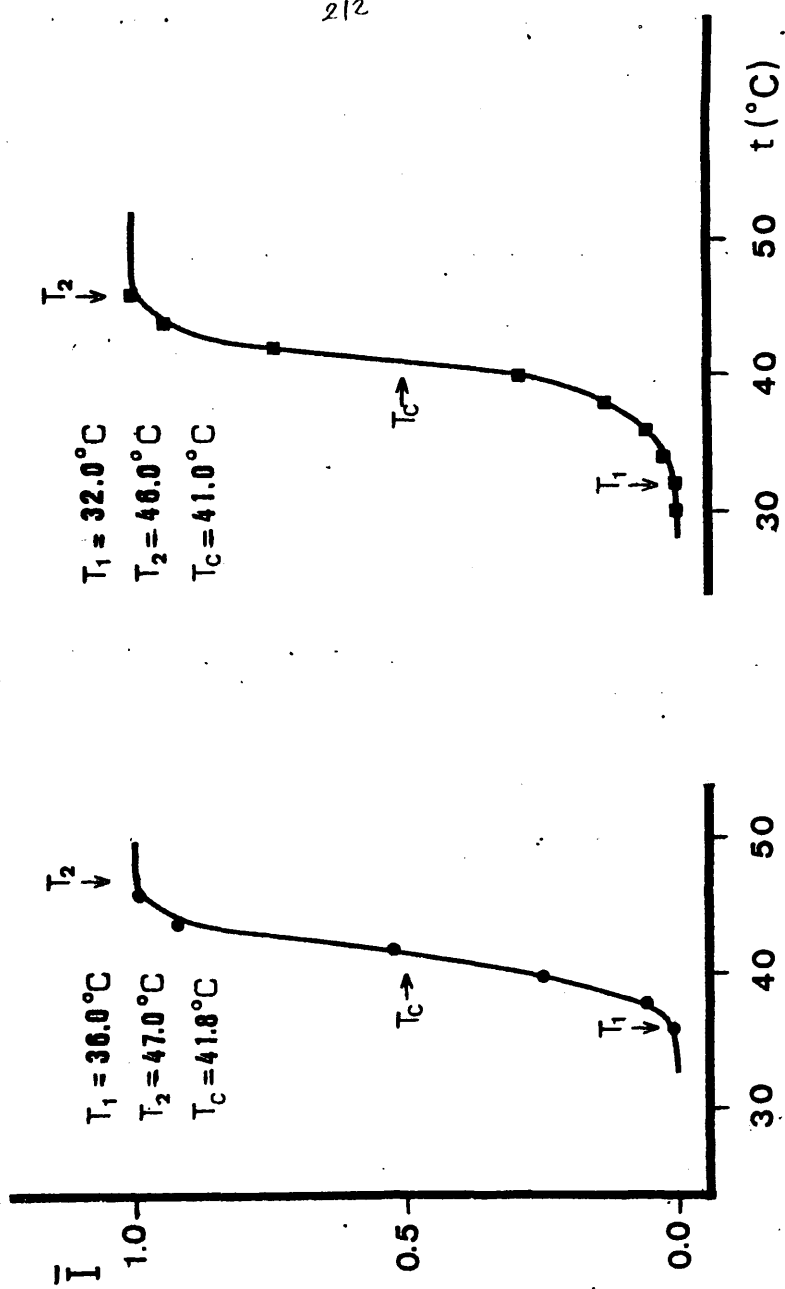


Fig. 34

del rango de temperaturas en que coexisten la fase gel y la cristal-líquido. Este efecto se produce esencialmente, a costa de una fluidificación de la fase gel.

214

PRUEBAS CON MONOCAPAS

"

PRUEBAS CON MONOCAPAS

La técnica de capas monomoleculares, constituye una importante herramienta en el estudio de actividades biológicas a nivel de membrana, de la que no hemos querido dejar de hacer uso, dada su utilidad en nuestro problema.

En las monocapas de lípidos, éstos adoptan una configuración en la interfase aire-agua, similar a la que poseen en la membrana; la formación espontánea de / esta capa monomolecular cuyas características permiten asimilarla a una mitad de la capa lipídica bimolecular, facilita el estudio de los fenómenos que tienen lugar / en la interfase agua-lípido, bien sea con los componentes naturales de membrana, bien por la incorporación de un elemento ajeno a ella. De esta manera, puede obtenerse información directa sobre la penetración ó no en dicha estructura, de determinadas moléculas de interés / biológico; asimismo, es posible conocer las condiciones de interfase que estuvieran influyendo sobre el proceso.

No obstante su utilidad, el modelo — como ya se explicó —, tiene sus limitaciones, en cuanto que al suponer únicamente la mitad de la membrana, en la investigación de interacciones lípido-proteína, no puede determinarse con tanta aproximación la arquitectura que / el conjunto molecular presenta en el orgánulo natural.

En nuestro caso, hemos tratado de estudiar, - las modificaciones que el Exto. de mirto, induce en la interfase fosfolípido-agua, así como las característi-

cas. que ésta presenta por la interacción del conjunto lipídico con el extracto. En este sentido, influye también la composición lipídica de la monocapa. Por ello, decidimos llevar a cabo un estudio con este modelo, para en unos casos aclarar y en otros completar, alguna de las informaciones conseguidas mediante el modelo de liposoma.

Una de las primeras dificultades con que nos encontramos, fué la mayor delicadeza que el modelo de monocapa presenta frente al de liposoma, en el sentido de que el conocimiento de la naturaleza química de los componentes de la monocapa y de las sustancias que intervienen en la interacción, es un requisito fundamental, cuando se pretende explotar al máximo dicha técnica. Ello lleva implícito, la necesidad de trabajar con especies químicas definidas. En consecuencia, el hecho de que nuestro elemento problema sea un extracto con / la complejidad de composición que esto conlleva, supone que nuestro nivel de conclusiones se ve limitado / considerablemente.

Otro de los factores que hubo de ser tenido en cuenta en estas experiencias, es la falta de homogeneidad de los extractos. Si bien ello no afectaba de / forma apreciable la reproductibilidad de las pruebas con liposomas, la sensibilidad de la técnica de monocapas, nos obliga — como se expondrá más adelante — a realizar las experiencias en grupos cuyos resultados / sólo son estrictamente comparables en su aspecto cualitativo. Podría pensarse en la posibilidad de obtener suficiente cantidad de una solución de extracto única homogénea, a partir de los liofilizados individuales, y realizar con ella todas las pruebas. Sin embargo, pudimos comprobar, que el almacenamiento en solución, conducía a degradaciones, no detectables por el test de /

aglutinación, que la mayor sensibilidad de la técnica de monocapas pone claramente de manifiesto. Esta es la razón, por la cual, hemos operado reconstituyendo diariamente dos liofilizados de extracto, asegurándonos / con ello la actividad de nuestro sustrato problema, aunque los resultados no fueran reproducidos exactamente de un día a otro.

Por consiguiente, cada una de las diferentes pruebas que se presentan, es autoconsistente, esto es, que al estar constituidas las subfases por solución de extracto procedente de la misma preparación, los resultados son perfectamente comparables en su aspecto cuantitativo. Es importante reseñar, que a lo largo de cada prueba se realizaron varias comprobaciones de que / no se había producido pérdida de actividad detectable, en el extracto. Para tales comprobaciones se utilizó como referencia, la isoterma que rinde la PC cuando la subfase está formada por extracto de la concentración y actividad que nos interesa.

Las consideraciones generales sobre el método operativo, han sido ya descritas en el capítulo de Materiales y Métodos. Unicamente recordar, que de cada / monocapa, se obtuvieron dos isotermas, la primera correspondiente a una subfase de tampón ácido cítrico / PO_4HNa_2 pH= 5'45, y la segunda a una subfase de extracto en dicho tampón, en la concentración escogida. La temperatura de operación, fué de $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$. El número total de moléculas de lípido sembradas — para una superficie total disponible de $472'5 \cdot 10^{16} \text{ Å}^2$ — fué, en todos los casos de $1'45 \cdot 10^{16}$ moléculas ($2'41 \cdot 10^{-8}$ moles), a fin de facilitar la comparación de resultados.

Hechas estas observaciones, y dado que el objeto de nuestro estudio es determinar la influencia / del extracto sobre las características de monocapas de

distinta composición, pasamos a exponer, los resultados obtenidos en una serie de pruebas previas con monocapas de PC.

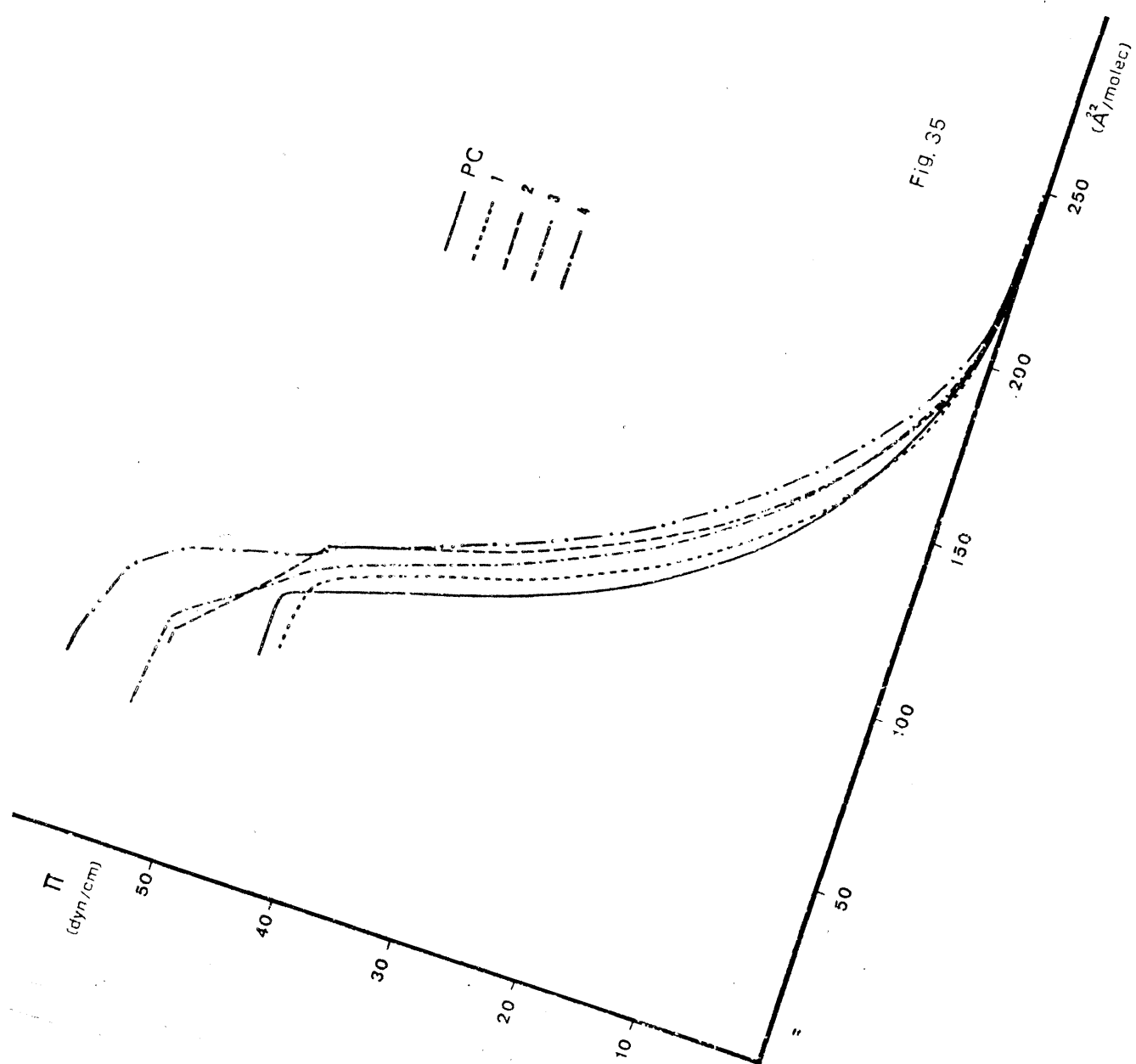
Monocapas de PC

En primer lugar, procedimos a comprobar, si el extracto de mirto, en las concentraciones que iba a ser utilizado, daba monocapa. En todos los casos, se obtuvo una superficie vacía en el barrido de compresión.

Al sembrar PC sobre una subfase que contiene extracto, la isoterma que se registra indica que la monocapa formada es más expandida que la que se obtiene con la misma PC sobre una subfase carente de extracto (tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 pH= 5'45). En la Fig. (35) ofrecemos las isotermas de PC, registradas en ausencia de extracto, y para cuatro concentraciones crecientes de éste. Como se puede apreciar, no se producen cambios significativos en la compresibilidad de las monocapas.

El efecto expansivo observado, se interpreta como la consecuencia de la penetración en la monocapa, de al menos uno de los componentes del extracto. Nosotros postulamos en principio, que dicho componente, sería la fitohemaglutinina del mirto.

La Fig. (36), corresponde a la representación para distintas Π del área media ocupada por cada molécula de fosfolípido, frente a la concentración de extracto. De ella se deduce que, a pesar de la aparente disparidad de los resultados, es posible estimar la existencia de una proporcionalidad entre el efecto expansivo, y la concentración de extracto en la subfase.



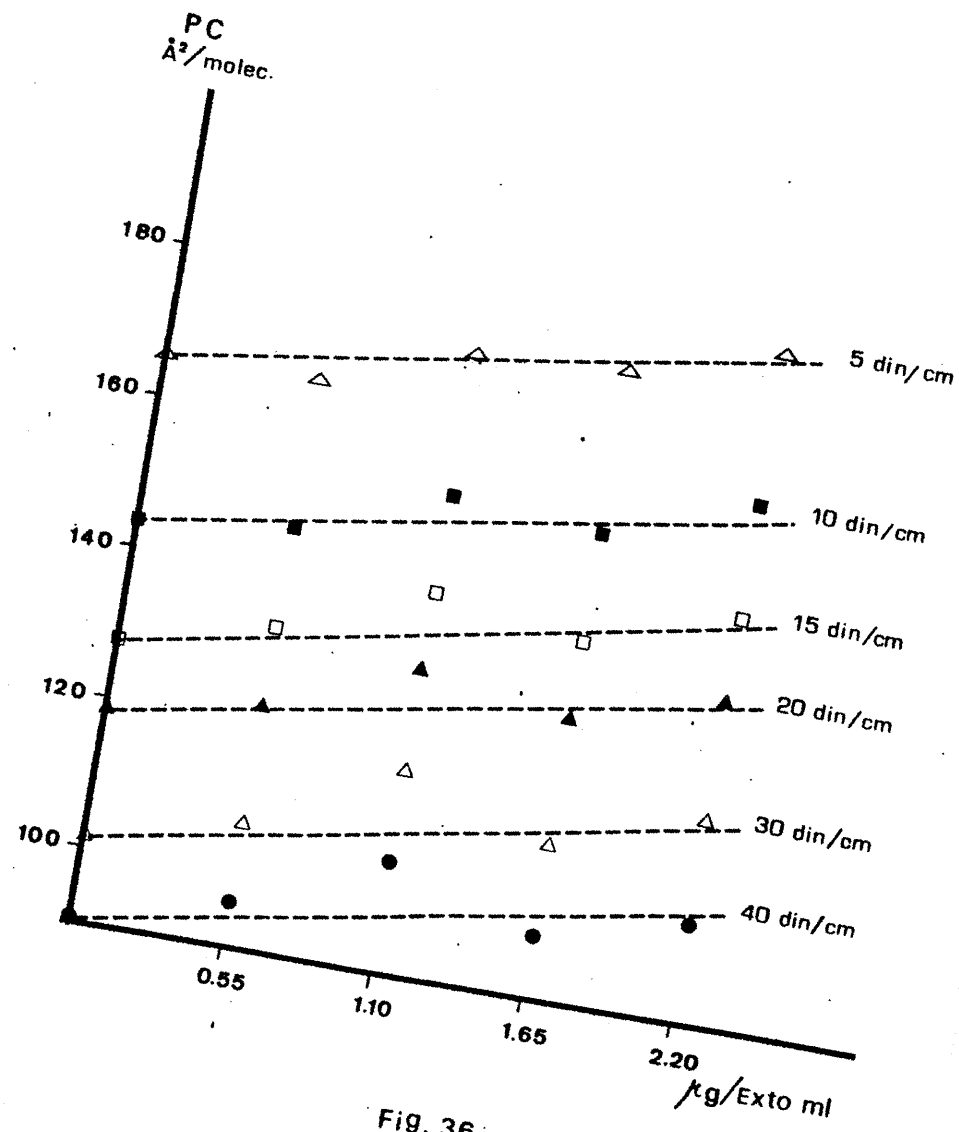


Fig. 36

Las líneas rectas ajustadas para representar dicha proporcionalidad directa, a cada Π , son prácticamente paralelas entre sí, confirmando con ello, la ausencia de cambios significativos en la compresibilidad. Al mismo tiempo, esto nos indica, que el aumento de presión superficial no conduce a la expulsión de la sustancia / que ha penetrado la monocapa, hecho este que ya pudo apreciarse en la red de isotermas..

Aunque el comportamiento de las monocapas de PC con las distintas concentraciones de extracto, parece responder en líneas generales al que acabamos de exponer, no podemos ignorar la existencia de un punto / singular para la concentración de 1'1 μg extracto/ml . En este caso, si bien a presiones superficiales bajas su comportamiento no se desvía de la recta que implica la mencionada proporcionalidad, al aumentar la presión superficial se observa una desviación creciente. Hasta el momento, este hecho no ha podido ser interpretado, si bien confiamos en un futuro, obtener más información al respecto, una vez se disponga de la fitohemaglutinina aislada.

Para presiones superficiales $\Pi > 40$ din/cm , entramos en la zona de colapso de la monocapa, donde / ya se producen importantes alteraciones por la presencia del extracto, y que a continuación pasamos a analizar.

La monocapa de PC sobre tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 , $\text{pH} = 5'45$, colapsa en la región de 47 din/cm. Cuando la subfase está constituida por extracto a distintas concentraciones, todas las isotermas, presentan un punto singular en dicha región; este punto va siendo progresivamente más impreciso, a medida que la concentración de extracto aumenta, llegando a aparecer a presiones mayores, un nuevo colapso. En la Fig. (37) /

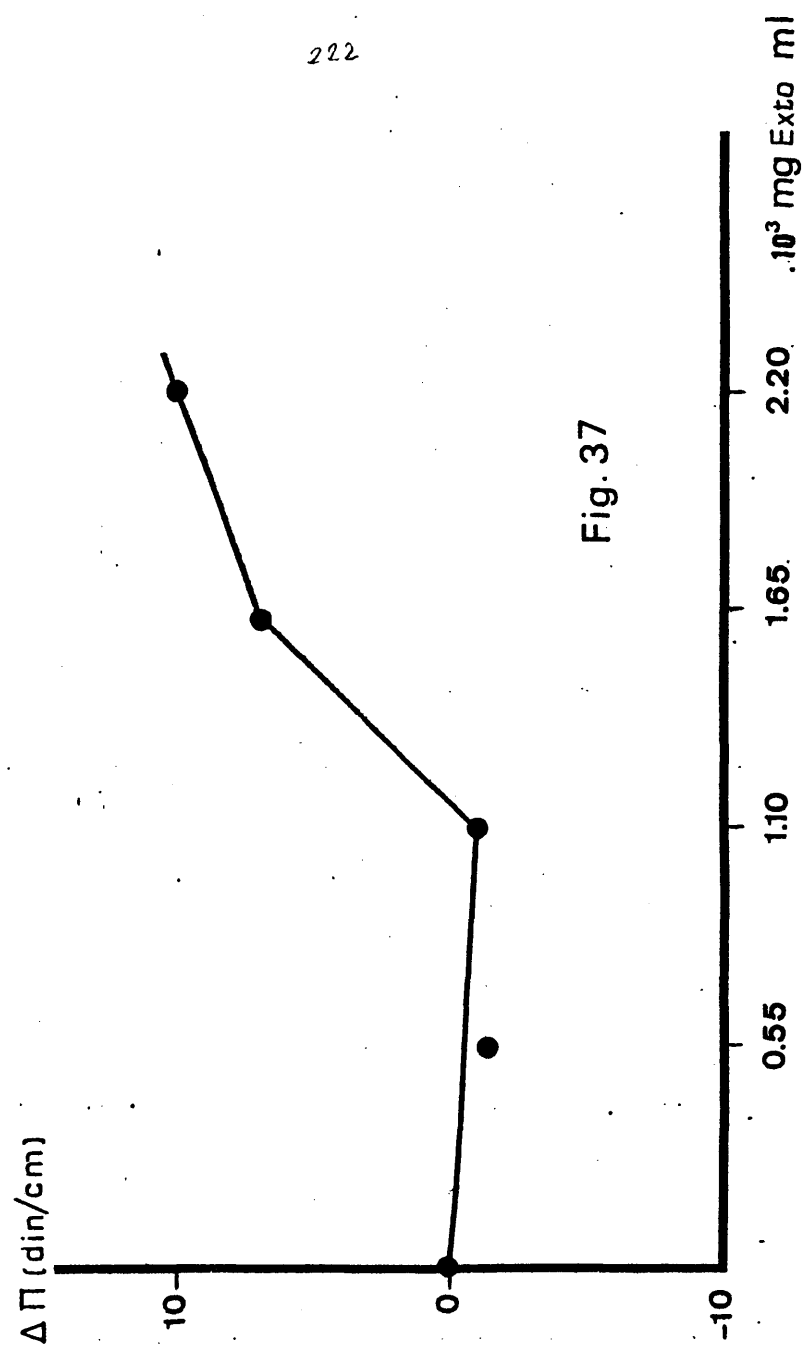


Fig. 37

hemos representado el incremento en la presión de colapso — respecto a la de la PC sobre tampón — frente a la concentración de extracto.

Este efecto del extracto sobre la monocapa / de PC, refleja la existencia de dos fases inmiscibles, una de ellas formada por las moléculas de PC libres, y otra pudiera estar constituida por un complejo aglutinina - PC; es decir, la aglutinina debido a su fuerte afinidad por el fosfolípido y a su carácter anfifílico, penetraría la monocapa, interaccionando posiblemente / con un reducido número de moléculas de PC situadas a su alrededor. Este complejo, no sería miscible con las moléculas de PC libres de la monocapa. Al aumentarse la concentración de extracto y en consecuencia la proporción de aglutinina que penetra la monocapa, se va reduciendo el número de moléculas de PC libres en la superficie, siendo posible el llegar a registrar la / presión de colapso de la nueva monocapa formada por complejo PC - fitohemaglutinina. Sin embargo, el hecho de que el punto de colapso de la PC sea todavía observable, y que el colapso de la nueva monocapa no sea / muy neto — a la concentración más elevada de extracto con que se ha trabajado — nos indica que no se ha alcanzado a establecer la relación estequiométrica del / complejo implicando todas las moléculas de PC disponibles.

Por otra parte, el efecto expansivo que se / aprecia en las isothermas, no debe considerarse como un incremento del área por molécula de fosfolípido, sino debido a la incorporación a la monocapa de una molécula de tamaño molecular considerable, como la aglutinina. En nuestra opinión la penetración de ésta, contrae / ría la monocapa al establecerse la interacción fitohe-

maglutinina - PC, pero teniendo en cuenta el incremento de superficie que conlleva la entrada de una molécula mucho mayor que la de PC, el balance final sería el efecto expansivo que se observa.

Tras el análisis de la influencia de la concentración de extracto sobre la monocapa de PC, no parece existir fundamento para la elección preferente de una determinada concentración de trabajo. Por ello, y dado que la de 1'1 µg extracto/ml corresponde — según el número de moléculas de PC sembradas — a la misma / relación Exto./PL (P/P) que la utilizada en las pruebas con liposomas, decidimos trabajar con ella. No obstante, es importante señalar que la situación de disponibilidad de aglutinina por el fosfolípido, es diferente, y de momento, escapa a nuestro control.

El continuar las experiencias en este sentido, no procede, ya que no podría obtenerse nueva información en tanto no se disponga de la especie química / pura que penetra la monocapa.

Monocapas mixtas de PC : PE

El objetivo de este grupo de experiencias, / fué estudiar la influencia que, sobre la incorporación de la aglutinina a la monocapa, tenía la variación del grupo polar del fosfolípido.

La composición de la PE- huevo en cadena de ácidos grasos, es algo distinta de la que posee la PC- huevo, pero como puede comprobarse en la tabla siguiente (100), las diferencias no son fundamentales.

	PC _h		PE _h
	a	b	
C ₁₆	33'6	36'2	22'0
C ₁₈	20'3	13'4	27'0
C _{18:1}	25'8	36'9	24'0
C _{18:2}	11'2	10'8	7'3
C _{20:4}	7'5	1'8	2'5
C _{20:6}	2'2	0'8	16'6

a y b : primera y última parte, respectivamente, del pico de elución en la cromatografía por Ac. Silícico.

La característica que diferencia esencialmente a ambos fosfolípidos, es su grupo polar; aunque éste es neutro (zwitterion) tanto en la PC como en la PE, la sustitución del grupo $-\overset{+}{N}(CH_3)_3$, bastante voluminoso, por el $-\dot{N}H_3$, notablemente menor, supone un cambio en la disposición espacial en la interfase lípido-agua. Así, el primero tiende a situarse en perpendicular a dicha interfase, mientras que el

segundo puede hacerlo en paralelo. Esta última disposición, permite que puedan interactuar electrostáticamente los grupos fosfato y amina de moléculas adyacentes. Por esta razón, a igualdad de cadenas hidrocarbonadas (249) la PE da monocapas más condensadas que la PC .

En nuestro caso (Fig. 38), las isotermas de PE y PC sobre un sustrato de tampón ácido cítrico / PO_4HNa_2 pH = 5'45, siguen un comportamiento análogo al descrito por Phillips y cols (249). Así, a pesar de que por la composición de sus cadenas, la PE da una típica monocapa expandida, esta característica es menor que en el caso de la PC. Por tanto, dado que las cadenas de ambos fosfolípidos no difieren esencialmente entre sí, y en las condiciones experimentales de trabajo se encuentran en estado cristal-líquido, vamos a tratar de comprobar, si la penetración de la monocapa por la aglutinina, se ve afectada por la diferencia en los grupos polares, y el distinto grado de condensación de la monocapa que ello conlleva.

En la Fig. (38) ofrecemos las isotermas registradas para la PC y la PE sobre sustrato de tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 pH = 5'45, y cuando en el mismo se halla presente el extracto. En nuestra opinión, queda claro que la magnitud del efecto expansor de la fitohemaglutinina, es inferior para la PE que para la PC, lo que se interpreta, como debido al grupo polar de la primera, que influye dificultando la penetración.

A continuación, hemos estudiado, este mismo efecto sobre monocapas mixtas de PC : PE. Las isotermas obtenidas para las proporciones 75:25, 50:50 y 25:75 , así como para los componentes puros, sobre subfase de tampón, se presentan en la Fig. (39). En la misma, puede apreciarse, cómo las monocapas resultan progresivamente más expandidas a medida que aumenta la proporción

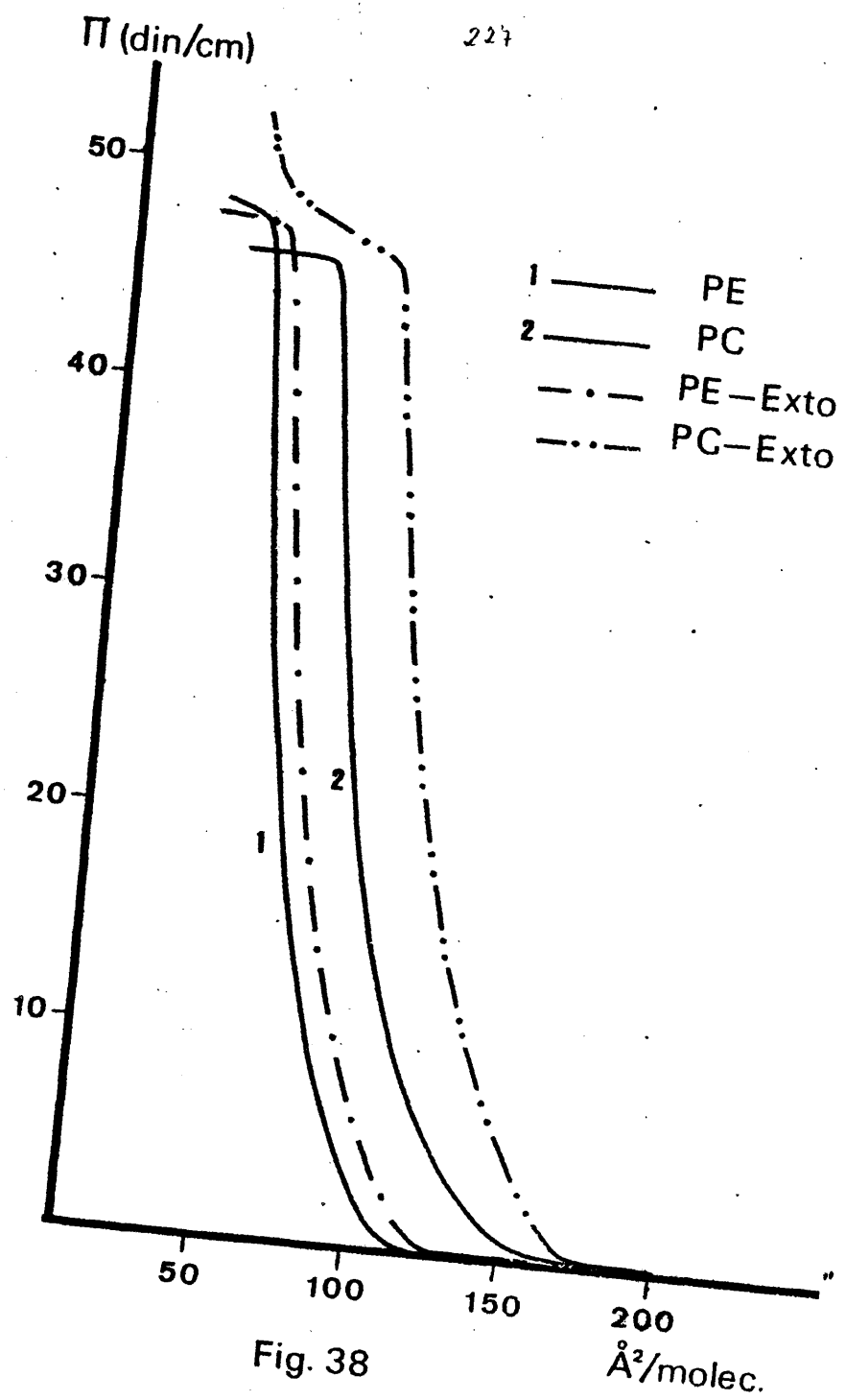
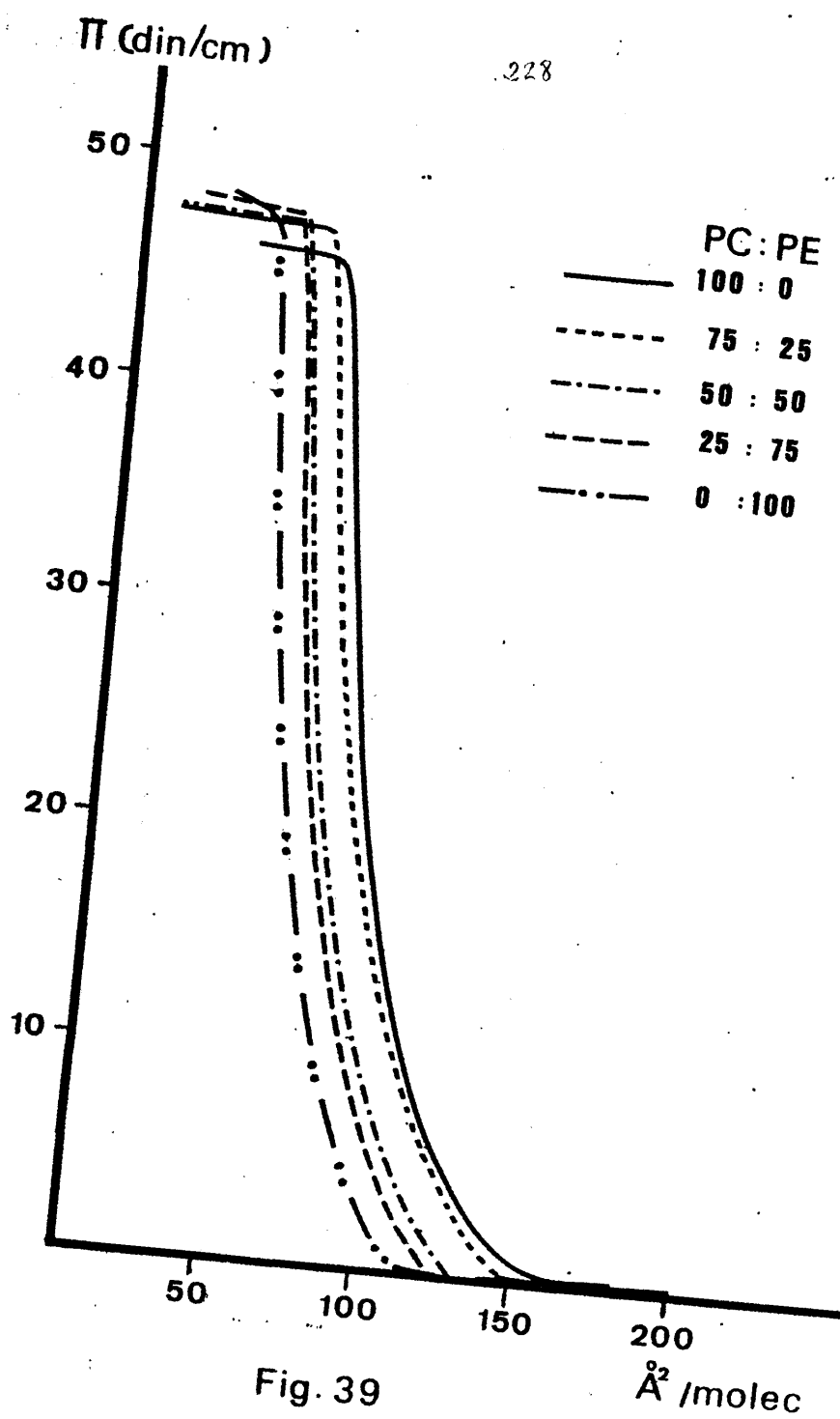


Fig. 38

 $\text{\AA}^2/\text{molec.}$



de PC. Este hecho, queda reflejado cuantitativamente / en la Fig. (41 A), en la que se ha representado el área media por molécula ($\text{\AA}^2/\text{molec.}$) frente a la fracción molar de PE. Las líneas discontinuas reflejan el comportamiento ideal en todo el rango de fracciones molares, a $\Pi = 5$ din/cm, $\Pi = 20$ din/cm y $\Pi = 40$ din/cm. A este comportamiento, se ajustan completamente, las monocapas mixtas, lo cual es indicativo de miscibilidad entre los dos componentes.

En cuanto a la zona del colapso, (Fig. 39) , no parece existir ningún comportamiento particular, simplemente, dado que la PE colapsa a presiones superficiales superiores que la PC — pero muy próximas — el incremento en la proporción de ésta última va rebajando progresivamente el punto de colapso. Todo ello, refuerza la idea anterior de miscibilidad entre ambos / fosfolípidos.

Ya hemos visto, que la presencia del extracto en el sustrato, provoca la expansión de las monocapas de PC y de PE respectivamente. En la Fig.(39) puede observarse, por comparación con la Fig.(40) que las isotermas correspondientes a las monocapas mixtas sufrir también dicho efecto expansor. Dado que el sistema PC : PE sigue un comportamiento ideal en ausencia / de extracto, es de indudable interés el comprobar si / dicho comportamiento se sigue manteniendo en presencia del mismo. La Fig.(41 B) en la que las líneas discontinuas representan ahora el comportamiento ideal calculado a partir de las áreas medias de los componentes puros modificadas por la presencia de extracto, nos / ayude a analizar los resultados. Hemos de señalar que este comportamiento ideal, se refiere al que cabría esperar de no depender la penetración de la fitohemaglutinina, de la proporción PC : PE. La desviación que se

230

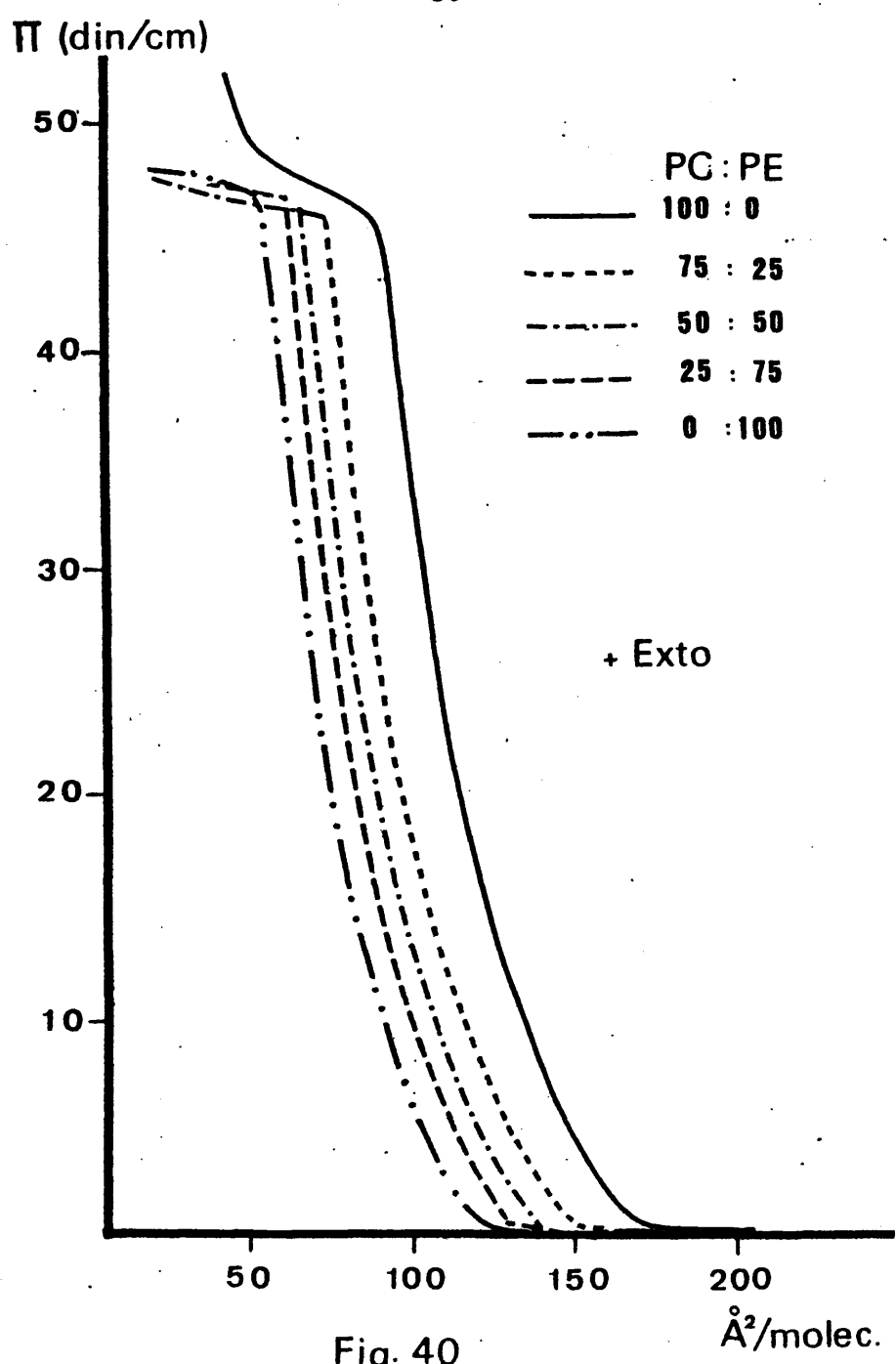


Fig. 40

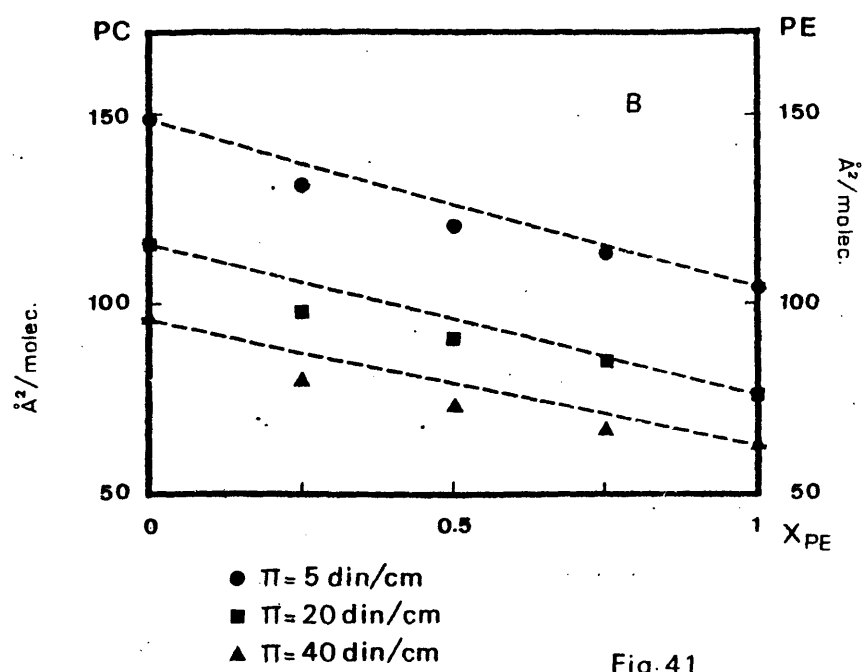
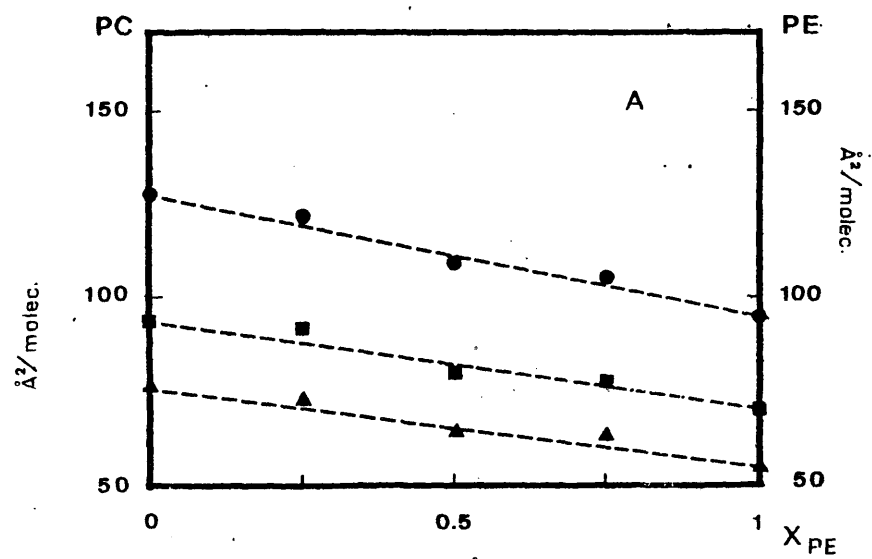


Fig. 41



observa es debido a que a pesar de que la presencia de extracto expande las monocapas de distinta composición, este efecto expansor es ligeramente inferior al que cabría esperar; es decir, respecto del comportamiento / ideal, las monocapas mixtas son más condensadas.

La región del colapso, no parece modificarse respecto al resultado obtenido sobre tampón ácido cítrico/ PO_4HNa_2 . En el caso de la $X_{\text{PC}} = 1$, el comportamiento es el esperado, siendo suficiente una pequeña proporción de PE (25%) para que la capacidad de interacción de la aglutinina con la PC disminuya considerablemente.

Monocapas mixtas PC : Colesterol

Los ensayos con monocapas mixtas de PC:colesterol, fueron realizados con objeto de estudiar la influencia que pudiera ejercer la presencia de colesterol en la monocapa, sobre la penetración de la aglutinina. Asimismo, resultaba de particular interés, el comprobar si entre estos datos y los obtenidos con liposomas, existía una correlación.

Como en otras ocasiones, se obtuvieron dos colecciones de isothermas, unas en las que el sustrato estaba constituido por el tampón habitual, y otras en las que aquel, contenía extracto de mirto en una concentración de $1'1 \mu\text{g/ml}$. Se trabajó, además de con los componentes puros, con tres proporciones molares PC:colesterol, 3:1, 1:1 y 1:3 respectivamente.

En ausencia de extracto, las isothermas mixtas (Fig. 42) muestran el conocido efecto condensante ejercido por el colesterol sobre las monocapas de / lecitina. Este efecto aumenta, al aumentar la presión de superficie. Los datos, están en concordancia con los existentes en la bibliografía (249).

Cuando el extracto se encuentra en la subfase (Fig. 43) puede observarse que si bien el colesterol sigue mostrando su efecto condensante, las monocapas son más expandidas que las que se obtienen sobre / un sustrato de tampón. El efecto, depende de la relación PC:colesterol (Tabla XXI). Así, por ejemplo, / cuando la fracción molar de colesterol es $0'25$, el efecto expansivo, — juzgado a través del incremento porcentual del área media por molécula —, no es significati

234

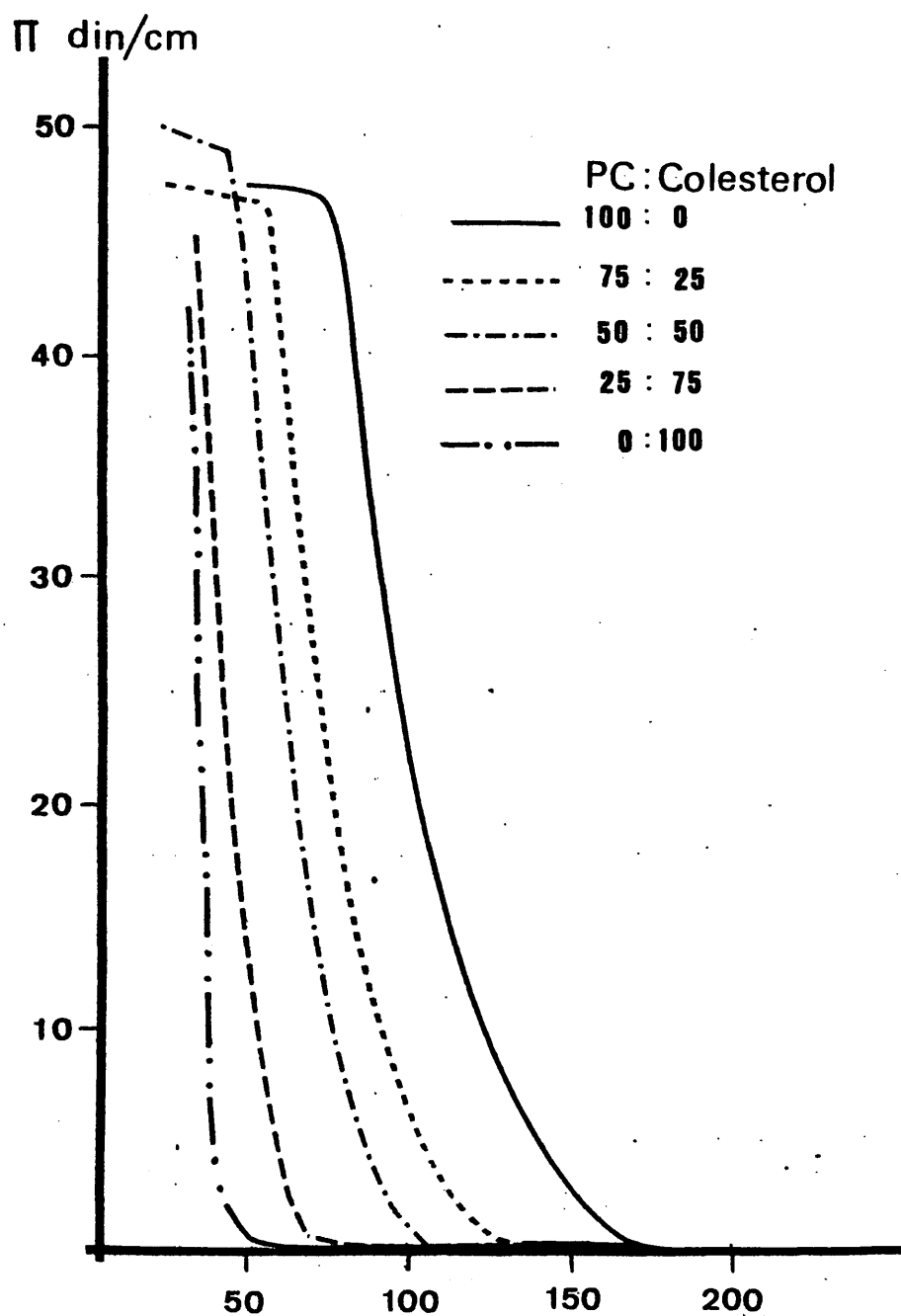


Fig. 42

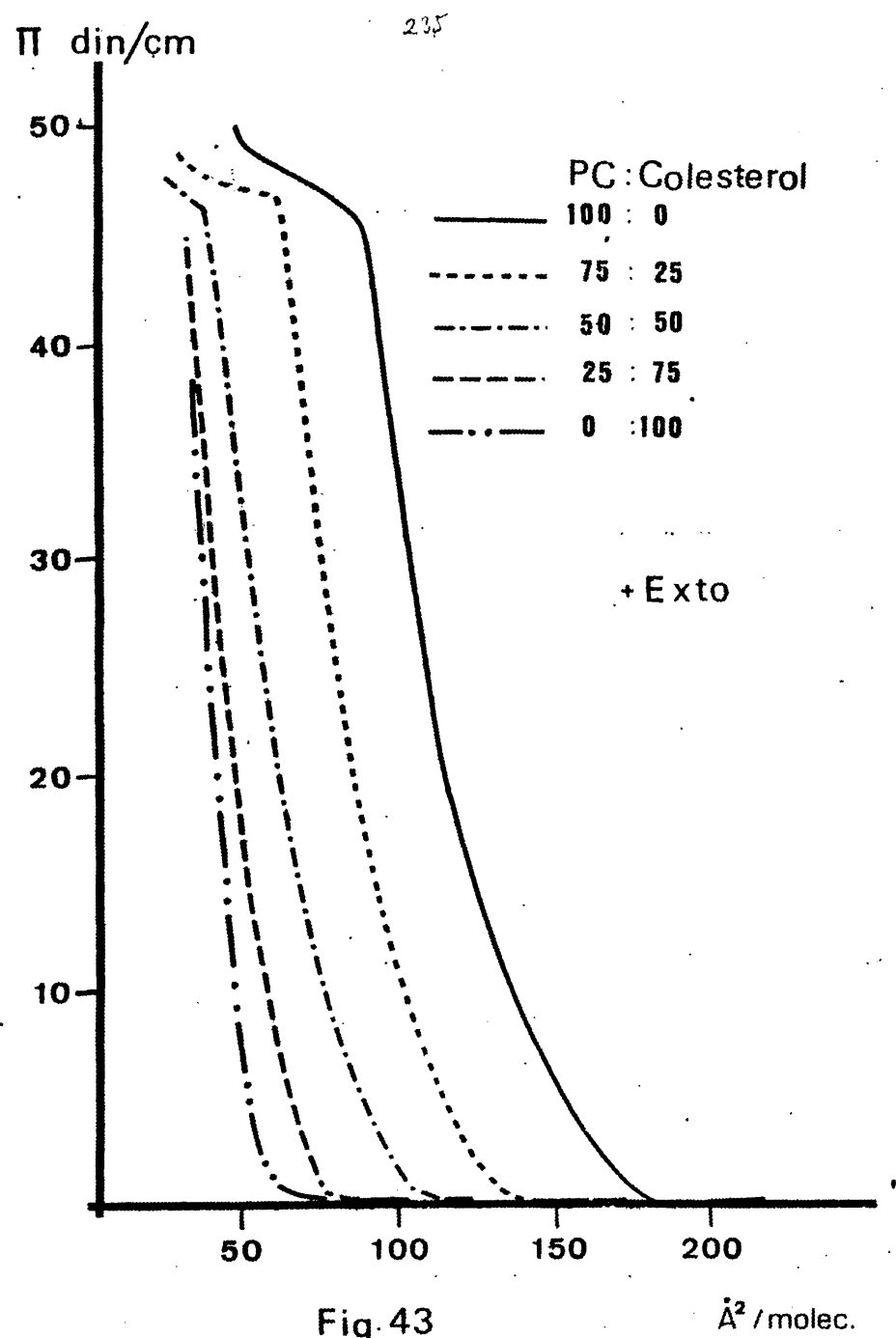


Fig. 43

Incremento porcentual del área media por
molécula, en monocapas mixtas PC : Colesterol, en
presencia de extracto de mirto.

← Δ % Area →

$x_{col.}$	π_1	π_2	π_3
0	11	12	13
0'25	13	15	14
0'50	10	3	1
0'75	9	6	5
1	34	15	0

$\pi_1 = 5 \text{ din/cm}$; $\pi_2 = 20 \text{ din/cm}$; $\pi_3 = 40 \text{ din/cm}$

T A B L A XXI

vamente distinto del que se produce en la monocapa de PC pura. Además, puede apreciarse, que tanto en un caso como en otro, el efecto es prácticamente independiente de la presión superficial. Ello parece indicar que la presencia de colesterol en esa proporción, no altera la capacidad de la aglutinina para penetrar la monocapa.

Sin embargo, dicha capacidad de penetración disminuye, cuando la fracción molar de colesterol es / de 0'5. A $\Pi = 5$ din/cm, la disminución es pequeña, pero a la presión de 20 din/cm es mucho mayor, llegando a / anularse el efecto expansor a 40 din/cm. Un comportamiento similar, se presenta cuando la fracción molar de colesterol es de 0'75, ya que si bien el efecto expansivo es superior, al aumentar Π , disminuye como en el caso anterior.

Finalmente, analizando las monocapas de colesterol puro, observamos que a presiones superficiales / bajas, existe asimismo, un aparente efecto expansor; no obstante éste disminuye, y a $\Pi = 40$ din/cm ya no se produce. El hecho, refleja en nuestra opinión, la expulsión progresiva de la aglutinina, al establecerse las fuertes interacciones a corto alcance entre el conjunto planar de anillos de las moléculas de colesterol.

En la Fig. (44) hemos representado el área media por molécula frente a la fracción molar de colesterol, para tres presiones superficiales: 5, 20, y 40- / din/cm respectivamente.

El comportamiento particular que presenta la monocapa mixta de $X_{col. 0'5}$ — Tabla XXI — puede estar relacionado con la existencia en ella de un complejo / lecitina - colesterol de estequiometría 1:1. Dicho complejo ha sido postulado por diversos autores en trabajos en los que se hace uso de diferentes técnicas. En

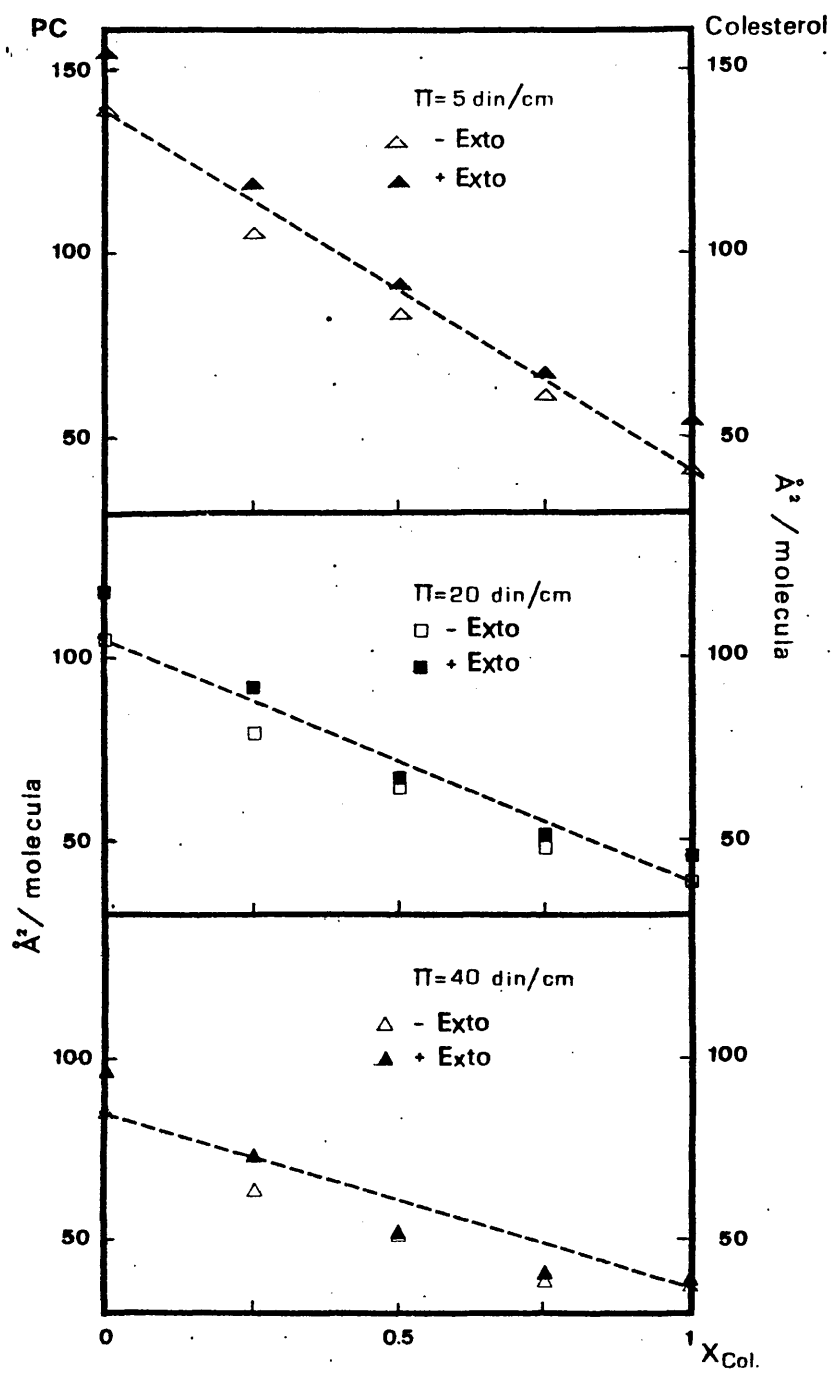


Fig. 44

base a esta hipótesis, los efectos observados con proporciones de colesterol inferiores ó superiores al 50%, pueden estar relacionados con la existencia, en tales condiciones, de dos fases en la monocapa: una constituida por complejo 1:1 y otra, de PC libre ó colesterol libre según que la fracción molar de éste último / sea < 0.5 ó > 0.5 respectivamente. En este último caso, la tendencia que muestra el incremento porcentual de área a disminuir, cuando Π aumenta, correlaciona / claramente con el comportamiento obtenido en monocapas de colesterol puro; es decir, tendría lugar una expulsión progresiva, de la aglutinina.

En lo que se refiere a la correlación de estos resultados con el comportamiento que se presenta / en las pruebas con liposomas, recordemos, que con estos modelos, la magnitud de la interacción, permanece invariable hasta una proporción del 37% de colesterol. Esto puede ser congruente con el dato de monocapas que refleja el mismo grado de expansión en el caso de PC pura, y de 25% de colesterol. Por otra parte, cuando / la proporción de éste último es del 50% se observa con liposomas un descenso acentuado en la magnitud de la interacción. Según hemos expuesto anteriormente, también para ésta proporción se apreciaba en monocapas un / efecto similar, ya que la penetración de la aglutinina se ve considerablemente reducida.

Monocapas de DPPC

Los datos obtenidos en las pruebas de fluorescencia del ANS, nos informaban sobre la influencia del extracto de mirto en la transición termotrópica de fase de este fosfolípido. Ella, nos indujo a utilizar / la técnica de capas monomoleculares, a fin de obtener nuevos datos que, siendo comparables, aportaran quizá confirmaciones del comportamiento observado con liposomas.

Para la realización de las pruebas, se siguieron las mismas pautas que en ocasiones anteriores, manteniéndose así mismo las condiciones de temperatura, y número de moléculas sembradas.

En la Fig. (45) ofrecemos las isotermas de / compresión, sobre un sustrato de tampón, y cuando a este se ha incorporado el extracto. Como puede apreciarse, en el primer caso el trazado concuerda con la isoterma típica de DPPC a 22°C, con la transición de fase característica. Esta, según la opinión comúnmente aceptada, supone el paso de una situación de líquido expandido, a otra de líquido condensado. Algunos autores, la atribuyen a una pérdida de moléculas de agua de hidratación del grupo polar. A presiones superficiales superiores a la correspondiente al final de la transición, la isoterma refleja un comportamiento característico / de monocapa condensada, fruto de la fuerte interacción entre las cadenas hidrocarbonadas del fosfolípido.

Hemos de señalar, que es un hecho ampliamente probado (249), la equivalencia entre esta transición bidimensional, y la transición de fase gel a cris-

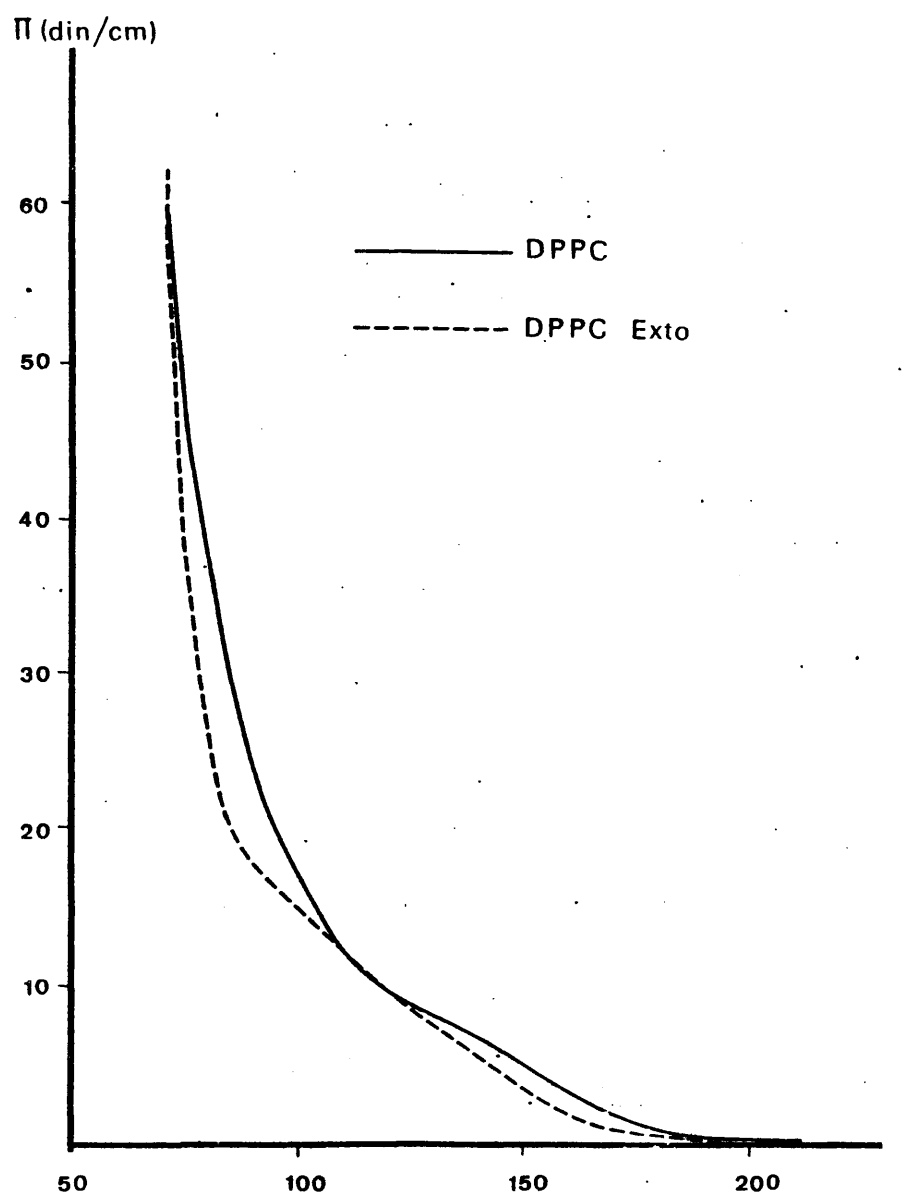


Fig. 45

 $\text{\AA}^2/\text{molec.}$

tal-líquido en un sistema de tres dimensiones (bicapas).

De la isoterma registrada, cuando en la subfase se encuentra presente el extracto, puede deducirse que el efecto inmediato, de este, es el de difuminar la transición. Por otra parte, a presiones superficiales bajas, y con anterioridad a la transición, se observa una acción condensante, que puede ser atribuida a un fenómeno de ocupación de huecos como el postulado por Shah y Schuman (250), e interacción atractiva con las cadenas totalmente saturadas de la DPPC . A partir de $\Pi = 2$ din/cm la monocapa, en presencia de extracto, presenta una compresibilidad uniforme como con secuencia de la difuminación de la transición de fase. Con posterioridad a esta, y a medida que Π aumenta, la isoterma, tiende a converger con la correspondiente a la monocapa de DPPC sobre tampón.

La interpretación clásica de este tipo de fenómeno, es la de que al aumentar Π , la especie molecular que había penetrado la monocapa va siendo progresivamente excluida de la misma. En nuestro caso, estimamos que dicha expulsión, comenzaría a una Π de alrededor de 18 din/cm. Hemos de añadir, que la causa de esta expulsión, se encuentra obviamente, en el establecimiento de interacciones entre las cadenas del fosfolípido que al ser energéticamente más favorables, desplazan al otro componente de la monocapa.

Este resultado, se encuentra en muy buena correlación con el efecto observado en el modelo de liposomas (sistema tridimensional), en el que el extracto parece ejercer asimismo un efecto de ensanchamiento de la transición de fase.

Monocapas mixtas PC : DCP

Estas experiencias, tenían como finalidad, el observar el efecto de la carga superficial, sobre la / capacidad de la aglutinina para penetrar la monocapa ,

En la Fig. (46) recogemos las isoterms debidas a los componentes puros, PC y DCP, en ausencia y presencia de extracto. En el caso de la PC, el comportamiento es igual al observado en otras pruebas, con esta misma concentración de extracto en la subfase, 1'1- μ g/ml. Respecto al DCP, sus isoterms reflejan que se trata de una monocapa bastante coherente, si bien en / presencia de extracto existe además un fuerte efecto _ condensante. La magnitud de éste, depende de la presión superficial, en el sentido de disminuir cuando ésta aumenta. Ello supone un paralelismo con lo observado en monocapas de DPPC. Dado que en ambos casos las cadenas hidrocarbonadas son saturadas y de 16 átomos de carbono, es lógico pensar que la condensación pueda estar / provocada por una penetración de la aglutinina, que interaccione fuertemente con las cadenas de DCP. Supuesto que en la superficie, las moléculas de DCP se encuentren formando islotes, al alcanzarse un cierto valor / de concentración superficial de éstos, penetraría la _ fitohemaglutinina interaccionando con las cadenas. El hecho de que a pesar del área ocupada por la aglutinina, a igualdad de Π esta monocapa sea más condensada / que la que se obtiene en ausencia de extracto, nos hace pensar en la posibilidad de que la molécula de fito. hemaglutinina en su zona polar, porte una carga neta _

244

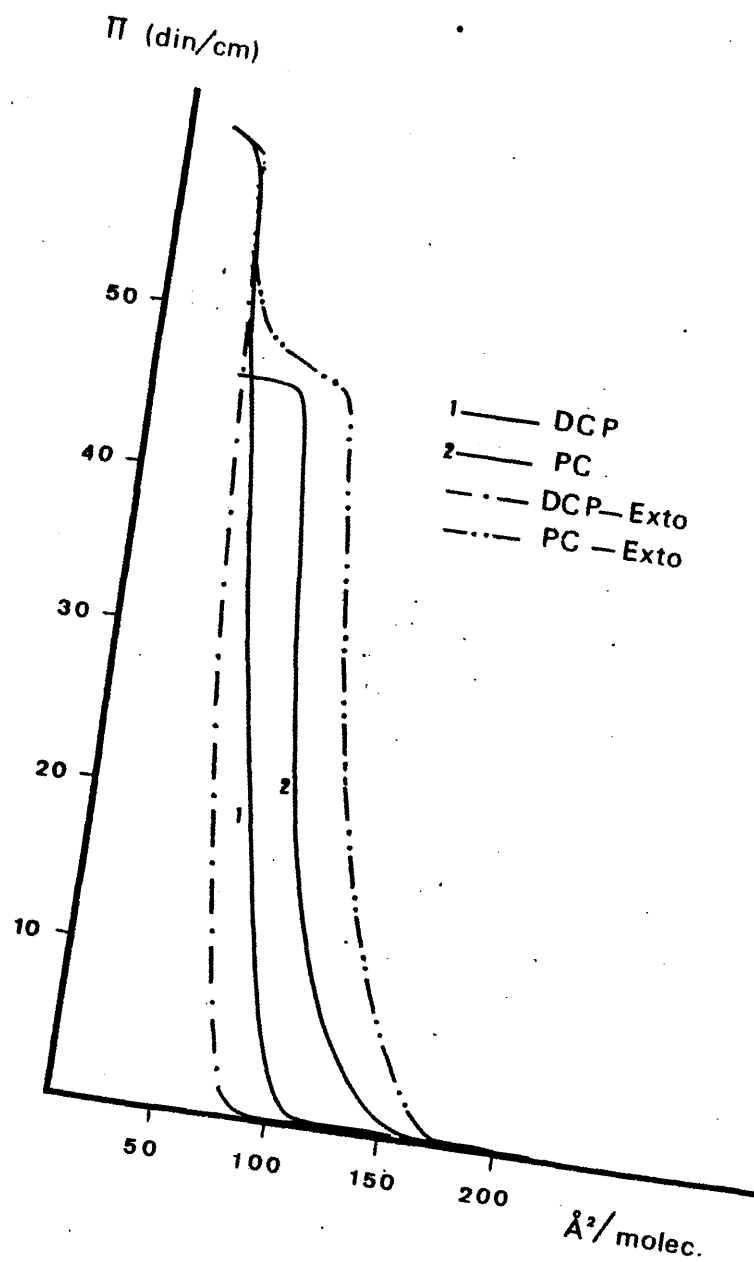


Fig. 46

positiva, lo que coadyuvaría de forma notable a la condensación, ya que ésta tendría lugar también a nivel / de grupos polares. El efecto de reducción del área total del sistema, sería la causa de que la isoterma no indique la existencia de presión superficial, sino a / áreas disponibles inferiores de las de la correspondiente monocapa sobre tampón. Desde el momento en que ello se produce, es decir $\Pi \neq 0$, comenzaría a nuestro entender la expulsión progresiva de la aglutinina, lo que / al igual que en el caso de la monocapa de colesterol , y la de DPPC, se comprueba por la confluencia de las / dos isotermas. Asimismo, el hecho de que el colapso de la monocapa en presencia de extracto sea idéntico al / obtenido sobre subfase de tampón, confirma la hipótesis que acabamos de exponer.

En las monocapas mixtas, hemos utilizado dos proporciones molares PC : DCP, correspondientes a 92:8 y 75:25 respectivamente. Las isotermas registradas, tanto en presencia como en ausencia del extracto, quedan recogidas en la Fig. (47).

Sobre subfase de tampón la monocapa que contiene una proporción del 8% de DCP, muestra un comportamiento prácticamente igual al de la PC pura. La del 25% de DCP resulta ser como era de esperar, más expandida que la del DCP puro, pero también más que la de / PC pura. Este último hecho, puede encontrar su explicación en el establecimiento de una fuerte repulsión entre los grupos fosfato de ambos componentes, que en / términos relativos sería mayor que en el caso de la lecitina pura en la que los grupos fosfato pueden interactuar con el grupo $-\overset{+}{N} (CH_3)_3$ de la misma molécula (250).

Contemplada la zona de colapsos, puede afirmarse que el sistema PC - DCP es miscible, al menos en

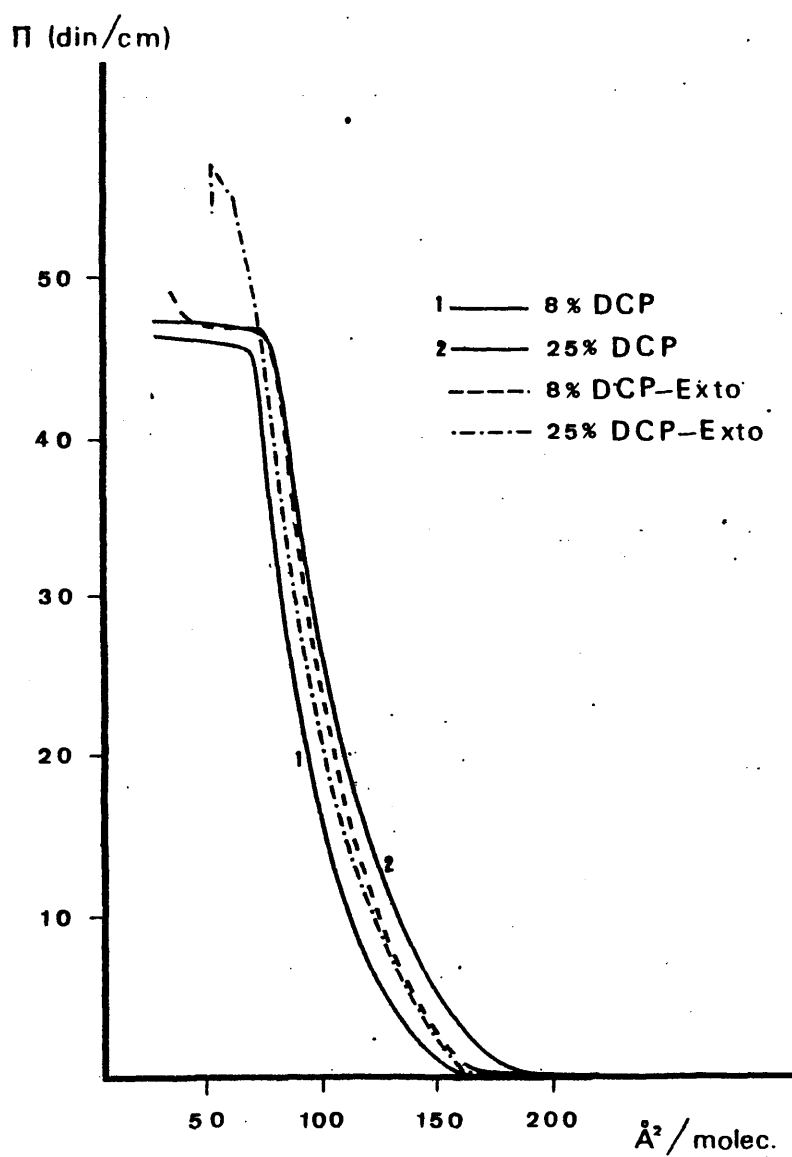


Fig. 47

las proporciones ensayadas.

Cuando el extracto de mirto se encuentra presente en la subfase, la conclusión que se extrae, es / que el DCP influye notablemente en la interacción. Así por ejemplo, es suficiente una proporción del 8% para que el efecto expansivo de la aglutinina sea menor que con la PC pura (Tabla XXII). El colapso no obstante, sigue siendo similar al de la monocapa de lecitina.

Con un 25% de DCP en la monocapa, y aunque / la PC es el componente mayoritario, se produce un efecto condensante que no depende de la presión superficial (Tabla XXII). En adición a esto, observamos que la monocapa presenta un único colapso a $\Pi = 55$ din/cm , es decir a Π superiores a las que colapsa la lecitina pura. Dado que comparada con esta última, no se produce precolapso de la PC cuando en la monocapa existe un 25% de DCP, deducimos que la composición del sistema / en estas condiciones, da lugar a una entidad supramolecular nueva.

Monocapas mixtas PC : E.A.

El objeto de estas pruebas, es el mismo que en el caso de las monocapas mixtas de PC:DCP, habiendo se seguido en todo pautas paralelas.

En la Fig. (48) presentamos las isotermas registradas, en presencia y ausencia de extracto, para / las monocapas de PC y EA puras. En ella puede observarse que sobre subfase de tampón la monocapa de EA es / muy coherente. La presencia del extracto en la subfase, induce una fuerte expansión, que en términos relativos, aumenta con la presión superficial (Tabla XXIII). En

268

Incremento porcentual de área media por
molécula en monocapas mixtas PC : DCP , en presencia
de extracto de mirto.

	Δ % Area		
x_{DCP}	Π_1	Π_2	Π_3
0	22	28	25
0'08	10	14	16
0'25	-7	-6	-6
1	-24	-22	-16

$\Pi_1 = 5 \text{ din/cm}$; $\Pi_2 = 20 \text{ din/cm}$; $\Pi_3 = 40 \text{ din/cm}$

T A B L A XXII

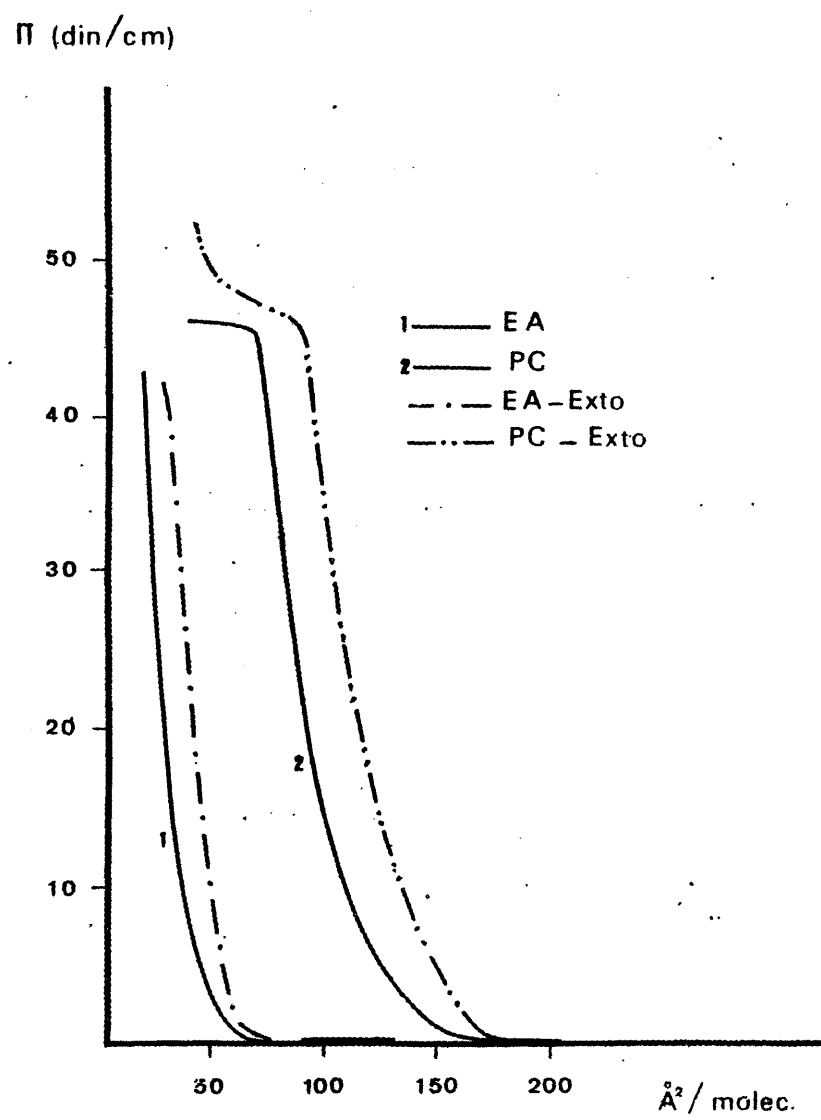


Fig. 48

Incremento porcentual de área media por
molécula en monocapas mixtas PC : E.A., en presencia
de extracto de mirto.

← Δ % Area →

$x_{E.A.}$	Π_1	Π_2	Π_3
0	24	28	24
0'08	7	8	8
0'25	5	8	10
1	26	48	64

$\Pi_1 = 5 \text{ din/cm}$; $\Pi_2 = 20 \text{ din/cm}$; $\Pi_3 = 40 \text{ din/cm}$

T A B L A XXIII

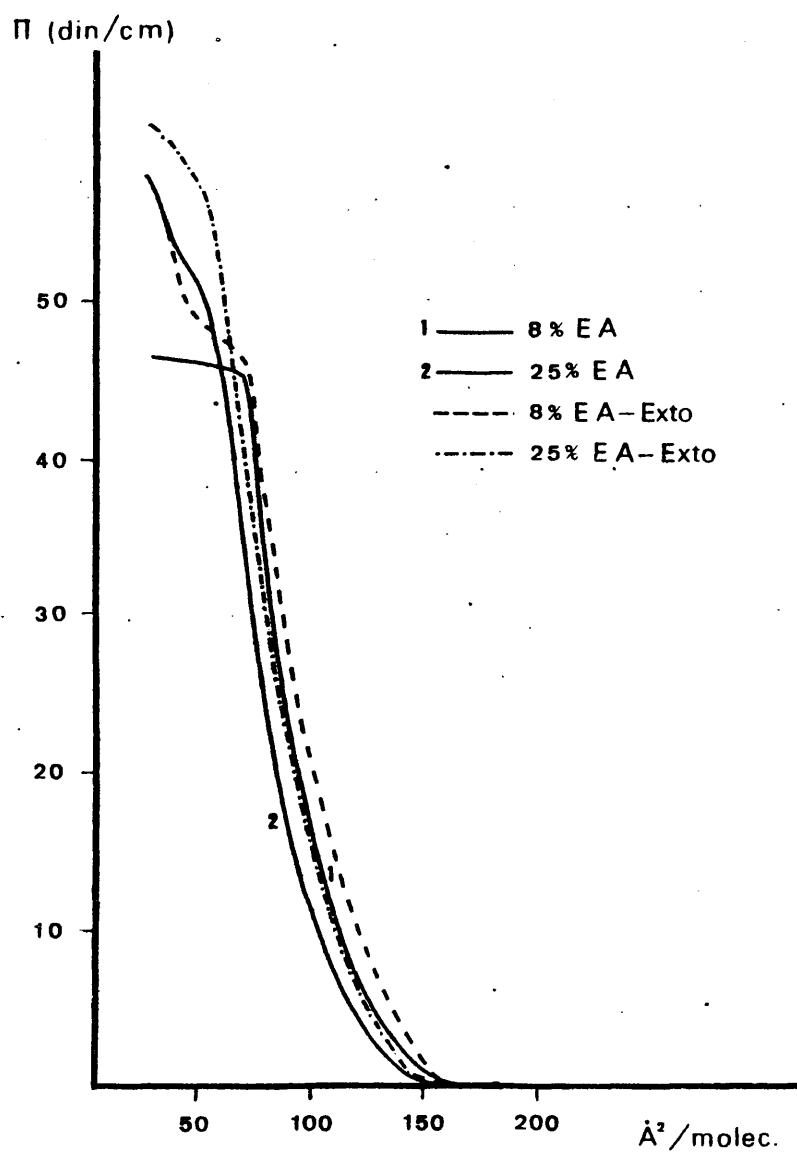


Fig. 49

ninguno de los dos casos se alcanza el colapso.

El efecto expansor, en nuestra opinión, no puede ser explicado en virtud de una penetración, ya que razonablemente cabría esperar un resultado semejante / al obtenido con DCP si la interacción hidrofóbica entre las cadenas se produjera. Además el efecto expansor es, como acabamos de decir, superior a medida que aumenta Π , lo que supone un comportamiento contrario / al esperado de existir interacción.

Aceptando la existencia de una carga neta positiva en la aglutinina, los resultados se explicarían por una interacción repulsiva de los grupos ionizados, la cual, lógicamente aumenta, al aumentar la densidad superficial de éstos.

Respecto de las isothermas correspondientes a las monocapas mixtas, (Fig.49), observamos que la del 8% EA sobre tampón es prácticamente igual que la de lecitina pura, y la del 25% es más condensada que la del 8%. Este hecho no es sorprendente si se tiene en cuenta los dos efectos que están jugando; en primer lugar, la sustitución de moléculas de PC por las de EA, considerablemente menores; en segundo término la atracción entre el grupo amino protonado y el fosfato de la PC.

El colapso de la monocapa con 8% de EA no es significativamente distinto del de la lecitina pura. / Sin embargo el correspondiente a la del 25%, a diferencia de lo que ocurre con DCP, no refleja un comportamiento ideal, lo que puede ser indicativo de que la EA y la PC son parcial o totalmente inmiscibles. La primera de estas opciones, parece la más probable, ya que / no se aprecia el colapso parcial de la PC pura.

Con el extracto presente en el subfase, la / monocapa con 8% de EA es más expandida que la correspondiente sobre tampón, pero no llega a alcanzar el /

grado de expansión que la PC. Ello podría significar / que se está estableciendo un impedimento para la penetración de la aglutinina. En términos de incremento / porcentual de área, el efecto expansor es independiente de la presión superficial. En el caso de la monocapa que contiene EA en un 25% se aprecia un efecto expansor que aumenta con la II. La probable inmiscibilidad del sistema, nos ha impedido llevar más allá el análisis de los datos, en este caso particular.

254

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Aspectos básicos

El extracto de semillas de *Myrtus communis* / posee una elevada capacidad hemaglutinante que no es _ específica de especie ni de grupo. Además, es capaz de interactuar con distintas fracciones lipídicas y lipoproteicas del suero, precipitándolas. Su actividad / sobre la membrana plasmática se pone también de manifiesto por su capacidad de alterar las características de tinción de este orgánulo en distintas células. Todos estos hechos, y muy particularmente la actividad hemaglutinante, han llevado a postular la existencia en dicho extracto de una sustancia clasificable como lectina. Las características de sus diversas acciones, reseñadas esquemáticamente más arriba, son las que nos han conducido, a pensar en la posibilidad de que la aglutinina pueda interactuar con la bicapa lipídica que / constituye el soporte básico de la estructura de la _ membrana.

Aunque una interacción directa lectina-bicapa puede no presentarse en todos los casos — de hecho la mayor parte de las lectinas más estudiadas son incapaces de actuar sobre liposomas constituidos exclusivamente por fosfolípidos — , lo cierto es que siempre / existe una relación entre las características de la bicapa y la capacidad hemaglutinante desencadenada por _ las lectinas. Además , como señala Ochoa (176) , es _

más que probable que la unión de una lectina con su receptor en la superficie de la membrana, quede establecida por una posterior interacción con la bicapa lipídica. Por otra parte, como puntualizan Schmidt-Ullrich y cols (182), otras actividades desempeñadas por las lectinas, distintas de la hemaglutinante, pueden ser debidas a otros mecanismos de interacción con la membrana.

Todas estas consideraciones son las que nos han llevado a plantearnos el estudio de algunas de las características de la acción del extracto de *Myrtus communis* sobre modelos lipídicos de membrana.

La principal dificultad con que nos hemos encontrado es precisamente la de no contar con la aglutinina purificada. Evidentemente este hecho supone, " a priori ", una merma considerable del nivel de conclusiones a las que se podría haber llegado en el caso contrario. La situación, además, impone un carácter esencialmente cualitativo a nuestros resultados; sólo en algunas de las experiencias se alcanza el nivel cuantitativo. Las deducciones que se logran, poseen por ello un cierto carácter especulativo. Sin embargo, en tanto no se disponga de la aglutinina aislada y caracterizada, no podremos matizar algunos de los hechos puestos de manifiesto en nuestro trabajo.

Nuestro intento para lograr el aislamiento de la aglutinina, cuyo resultado final ha sido la obtención de un extracto con doce veces mayor actividad específica que el que se venía utilizando, nos permite sin embargo afirmar, que la molécula responsable de la actividad hemaglutinante posee un cierto carácter anfifílico y un peso molecular inferior a 10.000, como se deriva de sus características de solubilidad y de las experiencias de diálisis y ultrafiltración. Pensamos /

que puede tratarse de un oligopéptido, posiblemente unido a un resto glucídico, como sucede en otras lectinas. Las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes del oligopéptido podrían ser particularmente hidrofóbicas. Una estructura de este tipo puede dar cuenta por / una parte del bajo contenido en N_2 detectado por análisis elemental del extracto, por otra, de sus características de solubilidad, y finalmente también del hecho de que la aglutinina pueda ser recuperada de las matrices a las que previamente se había fijado, simplemente por elución con agua destilada.

Un grave problema que incide en la dificultad de resolver el proceso de aislamiento de la aglutinina, es, en nuestra opinión, la ausencia de un método físico de valoración específica de esta sustancia. Nosotros hemos abordado esta cuestión a partir de observaciones / previas (68) de la influencia del extracto sobre la señal de fluorescencia del triptófano. El efecto, consistente en la amortiguación de dicha señal, es esencialmente atribuible a la aglutinina, según hemos demostrado en una prueba comparativa de efectividad de tres extractos, que teniendo la misma actividad aglutinante diferían en cuanto a su composición cualitativa y cuantitativa en otros componentes. De esta forma hemos logrado establecer una relación actividad aglutinante-concentración de extracto-amortiguación de la fluorescencia del triptófano, que puede resultar de gran utilidad en los futuros intentos de aislamiento y caracterización / de la aglutinina.

La interacción del extracto del *Myrtus communis* con liposomas se pone claramente en evidencia por / un brusco incremento en la turbidez de la dispersión

que contiene los modelos de membrana, efecto, que puede ser apreciado fácilmente a simple vista. El fenómeno no está asociado a una pérdida de la actividad aglutinante que, determinadas condiciones iniciales de concentración de extracto y de liposomas, puede ser total. Si se realiza una experiencia dirigida a la comparación de tres extractos con la misma actividad hemaglutinante, pero que dada su procedencia, difieren en el resto de componentes, los resultados que se obtienen de su interacción con liposomas, reflejan un grado de efectividad muy similar. El descenso en la actividad es, por otra parte, función de la relación entre la concentración del extracto y la de los liposomas.

A la luz de estos hechos es razonable postular que la aglutinina contenida en el extracto es esencialmente la responsable del cambio sufrido por la dispersión de liposomas. Esta premisa constituye la base de nuestra discusión de los resultados. Sin embargo, somos conscientes de que algunos aspectos de los mismos pueden estar sin duda influidos, por las restantes especies químicas que forman parte del extracto, aunque es nuestra firme opinión, que los hechos esenciales son debidos exclusivamente a la aglutinina.

Características generales de la interacción con los modelos de membrana

El resultado de la interacción del extracto con los liposomas se manifiesta, como ya se ha dicho,

por un fuerte incremento en la dispersión de la luz. El fenómeno, a la temperatura de las experiencias, 25°C, es muy rápido, como hemos puesto de manifiesto en las pruebas cinéticas, siendo la velocidad con que discurre función, para una concentración dada de liposomas, de la concentración del extracto. Sin embargo es muy probable, que la cinética observada corresponda a la sucesión de hechos subsiguientes a la incorporación de la aglutinina a la bicapa y no a esta etapa que, en consecuencia, debe ser prácticamente instantánea. Este comportamiento nos da idea de la fuerte tendencia que muestra la aglutinina a interaccionar con la estructura lipídica.

La magnitud de la interacción, depende tanto de la concentración de extracto como de liposomas. Para una concentración dada de éstos, aparece un fenómeno de saturación. La relación, entre las concentraciones de extracto y de liposomas, a la que tiene lugar el comienzo de la mencionada saturación, es prácticamente constante en las experiencias realizadas con distintas concentraciones iniciales de liposomas. Aunque es tentador el estipular, a partir de este dato, una relación estequiométrica, la misma no tendría mucho significado, ya que en todo caso estaría referida al extracto y no a la aglutinina, y la composición de aquel puede, sin duda, variar de unas preparaciones a otras.

Otro hecho que se manifiesta en los perfiles de las curvas de titulación es la existencia de un proceso de cooperatividad positiva. Al igual que en el caso de la cinética, no podemos afirmar que dicha cooperatividad sea una característica de la incorporación de la fitohemaglutinina a la bicapa, muy probablemente son los hechos posteriores los que muestran este com-

portamiento. Así, el mismo se puede explicar como reflejo de que la bicapa sufra en toda su extensión un / número determinado de " defectos ", promovidos por la aglutinina, antes de que la fusión con otra bicapa tenga lugar. Evidentemente, el número de " defectos ", es función de la concentración de la aglutinina.

Un importante resultado es el obtenido me-
diante el empleo de la microscopía electrónica. Así po demos observar que la consecuencia de la interacción / de la aglutinina con los liposomas es la fusión de sus lamelas dando lugar a estructuras multilamelares cerradas y finalmente a grandes masas lipídicas que en realidad consisten en extensiones de multibicapas. Dos hechos hay que resaltar: en primer lugar que la fusión , a diferencia de la agregación, necesariamente implica a la matriz lipídica de la bicapa; en segundo lugar, que esta estructura no se pierde, por lo que podemos / afirmar que la forma de actuar de la aglutinina no es la misma que ejercería un tensoactivo. Este último, literalmente disolvería la estructura de bicapa. Por lo tanto la acción de la aglutinina es más sutil, posiblemente introduciendo " defectos " que implican a la matriz lipídica y que inducen separaciones de fases.

La independencia del proceso respecto al pH del medio en un amplio intervalo, indica claramente / que las fuerzas electrostáticas no juegan un papel im-
portante en la interacción de la aglutinina con la bi-
capa del liposoma. Por otra parte, el comportamiento / frente a la temperatura es típico de los sistemas en los que el ensamblaje final de sus componentes se estabiliza mediante fuerzas de corto alcance, y que en me-
dios acuosos tienen su vector desencadenante en las /
fuerzas hidrofóbicas. Es más, la ausencia total de cualquier signo de interacción entre la aglutinina y /

los fosfolípidos cuando el medio es de moderada polaridad, como es el caso del metanol, reafirma sensiblemente la hipótesis de que las fuerzas hidrofóbicas juegan el principal papel en la asociación de la aglutinina / con la bicapa de fosfolípidos.

En sentido estricto, el proceso de fusión / de bicapas no requiere que tenga lugar la penetración de la matriz lipídica por la especie desencadenante / del fenómeno. Concretamente, el Ca^{2+} promueve la fusión de liposomas con grupo polar cargado negativamente y es obvio que el Ca^{2+} no puede penetrar al interior lipídico. Este ión, por el contrario, no desencadena la fusión de liposomas formados por fosfolípidos que, como la PC, no tienen una carga neta asociada a su grupo polar. En cambio la fusión de liposomas con composición mixta PC/PS, sí puede ser promovida por el Ca^{2+} . En este caso el fenómeno está ligado a una separación de fases que tiene lugar en el plano de la bicapa (191).

No obstante, la mayor parte de las sustancias químicas que provocan la fusión de liposomas, realizan su acción previa incorporación a la matriz lipídica (190).

El extracto de semillas de *Myrtus communis*, cuando se encuentra disuelto en una subfase acuosa, provoca la expansión de una monocapa de fosfolípidos. Nuestra hipótesis es que la aglutinina puede penetrar entre las moléculas de fosfolípido, pero manteniendo parte / de su propia estructura en la proximidad de los grupos polares. Quizás se mantenga unida a la interfase mediante ese hipotético grupo polar que hemos postulado anteriormente. En relación con esto es sorprendente / que una molécula que puede penetrar la monocapa de otro

compuesto, y a la que se le reconoce un carácter anfifílico, no forma monocapa por sí misma. Realmente no podemos dar una explicación a este hecho, excepto al apuntar la posibilidad de que la aglutinina muestre distinta conformación en un medio acuoso y en un medio apolar. Si es así, el cambio debe ser reversible, ya que la utilización de disolventes orgánicos no altera la posterior actividad hemaglutinante evaluada / en medio acuoso. Un cambio semejante al apuntado puede suceder en la monocapa.

Evidentemente se podría renunciar a este argumento, si se aceptara que la interacción con la monocapa tiene lugar, tan sólo, a nivel de los grupos polares. Sin embargo, esto no es probable, de hecho en monocapas de DPPC, DCP, e incluso de colesterol, así como a un auténtico proceso de expulsión de la aglutinina desde su posición original a la fase acuosa. Es más, los sucesos que tienen lugar a altas presiones superficiales en las monocapas de PC, son muy relevantes. La presencia del extracto en la subfase conduce, en nuestra opinión, a la aparición de una situación de inmiscibilidad en la monocapa, que se detecta por la existencia de un precolapso típico de la PC el cual va desapareciendo a medida que aumenta la concentración de extracto en la subfase. Finalmente, sólo / se detecta un colapso que tiene lugar a presiones y áreas superficiales mayores. Estos hechos no pueden explicarse si no se admite que la aglutinina ha introducido al menos parte de su estructura entre las moléculas del fosfolípido. En esa situación, se produciría una asociación con las moléculas lipídicas más / próximas de forma que el complejo aglutinina - fosfolípido, no resulta miscible con el resto del sistema, constituido por moléculas de PC libres. La causa de

esta inmiscibilidad, tiene que estar asociada con el efecto que sobre la transición de fase de la DPPC, hemos puesto de manifiesto en este trabajo, y del que / hablaremos más adelante. Es muy probable que el estado físico de las cadenas de las moléculas de PC asociadas íntimamente con la aglutinina difiera de las del resto, siendo ésta la causa de la inmiscibilidad.

La posibilidad de que las moléculas de fosfolípido adyacentes a moléculas proteínicas, estén en un estado físico distinto de las del resto de la bicapa, ha sido invocada por distintos autores para explicar efectos de modulación de la permeabilidad de membranas biológicas y de funciones enzimáticas que tienen lugar en las mismas (252); el mecanismo de acción de los anestésicos locales (253); y la acción de la Con A sobre liposomas de DPPC (160)

Efecto de cationes divalentes y azúcares

La presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} ó Mn^{2+} en el medio en el que tiene lugar la interacción, no es imprescindible para que la misma tenga lugar. Esto podría / apoyar la idea de que la aglutinina ejerce su acción en su forma monomérica, a diferencia de lo que sucede con algunas otras lectinas y muy concretamente con la Con A. Se observa, sin embargo, que a concentraciones bajas estos cationes tienen un ligero efecto negativo sobre la magnitud de la interacción. Dado que el orden de efectividad en esta acción es el mismo que se obtiene para la fusión de liposomas de PS y PA, y que / en primera etapa está ligado a la existencia de carga negativa neta en su superficie, pensamos que es /

precisamente el bloqueo de la carga neta, conferida a nuestros liposomas por el DCP, la causa de esta disminución en la acción de la aglutinina. Como por otra / parte el bloqueo de dicha carga negativa sería un factor favorable en cuanto que supone la abolición de la barrera energética que han de superar los liposomas / en la agregación previa a la fusión de sus bicapas, _ cabe suponer que el efecto negativo afecta a la incorporación de la aglutinina, posiblemente porque ésta / posea un grupo ionizable cargado positivamente con lo que su acceso a una bicapa cargada negativamente sería más favorable que a una bicapa sin carga superficial _ neta. La hipótesis de la existencia de dicho grupo iónico, se ve reforzada a la vista de los estudios realizados con monocapas de DCP y E.A.

Por su parte, ninguno de los azúcares monoméricos ensayados es capaz de inhibir la acción de la aglutinina sobre los liposomas, de la misma manera / que son incapaces de inhibir su acción hemaglutinante. Esta claro, que en este último caso la inhibición, de producirse, podría suponer la competición por un sitio de unión sobre la aglutinina, pero también podría tener lugar mediante un efecto alostérico. En la primera situación es evidente que el bloqueo del sitio de / unión no tiene porqué incidir sobre la capacidad de _ la aglutinina para penetrar la bicapa, pero en la segunda hipótesis sí podría hacerlo.

La ausencia de cualquier efecto significativo está en la línea de la observación realizada por / Ochoa (176) en cuanto que las lectinas que no son _ serológicamente específicas, ni tampoco son quimioespecíficas " in vitro ", son las que muestran mayor ca

rácter hidrofóbico. La aglutinina contenida en las semillas de *Myrtus communis* responde a este esquema.

Efecto de la composición de los modelos

La magnitud de la interacción del extracto con liposomas de DPPC, a temperaturas por debajo de / su transición de fase es algo inferior que en el caso de liposomas de PC a las mismas temperaturas, rango en el que este último sistema tiene su matriz lipídica en estado fluido. Esto puede estar relacionado con una menor capacidad de la aglutinina para penetrar entre las moléculas de DPPC, ordenadas en el estrecho / empaquetamiento que supone la fase gel. Un reflejo de ello puede ser la paulatina expulsión de moléculas de aglutinina que tiene lugar en la monocapa de DPPC a medida que aumenta la presión superficial y con ello el grado de condensación de las moléculas de fosfolípido. Algo similar ocurre en las monocapas de DCP, cuyas moléculas también poseen dos cadenas, totalmente saturadas, de 16 átomos de carbono. La fuerte interacción entre las cadenas dificulta en ambos casos el acceso de la aglutinina.

Un efecto semejante pudiera explicar la menor expansión que sufren las monocapas de PE respecto de las de PC. Sin embargo en este caso la responsabilidad no parece atribuible a las cadenas hidrocarbonadas, que como las de PC, se encuentran en fase de cristal-líquido a la temperatura de las experiencias, debido a su riqueza en insaturaciones. El hecho de que la

PE, tanto natural como sintéticas, de monocapas más / condensadas y posea temperaturas de transición de fase superiores a las de sus homólogas de PC, se atribuye a la diferencia en el grupo polar, que en el caso de la PE permite una atracción entre las cargas de los grupos fosfato y amina de moléculas adyacentes. En cualquier caso, el empaquetamiento resultante inhibe en / cierto grado la penetración de la aglutinina. La ausencia de efectos significativos sobre el colapso de la / monocapa de PE, es, sin duda, consecuencia de lo que acabamos de decir. Obsérvese que aún en presencia del extracto, la monocapa de PE resulta más condensada que la de PC realizada sin que la subfase lo contuviera.

Por otra parte, aunque las monocapas mixtas de PC/PE parecen seguir un comportamiento ideal, cuando la subfase consiste sólo en el medio tamponado, esto no es así, cuando en ella incluimos el extracto, de forma que no cumple la regla aditiva calculada a par-, tir de las áreas de los componentes puros, modificadas por la presencia del extracto. En nuestra opinión esto se debe a los fenómenos que tienen lugar en la zona de los grupos polares y que encierran dos efectos. El primero de ellos se debe al hecho de que en las monocapas mixtas pueden seguir estableciéndose las relaciones de atracción entre los grupos amina protonados y los grupos fosfato, pero ahora implicando a algunos de estos pertenecientes a la PC. Ello podría conllevar un cierto efecto de condensación. Sin embargo la experiencia no lo pone de manifiesto. Las monocapas mixtas PC/PE, en tampón, muestran comportamiento ideal. Pero no podemos olvidar que debido precisamente a esa interacción, la monocapa mixta puede adquirir cierta carga superficial neta positiva por medio de los grupos trimetil amonio, de manera que el efecto repulsivo entre ellos

equilibraría la situación. Esta barrera de carga positiva puede dificultar de forma notable el acceso de moléculas de aglutinina, ya que en base a los resultados obtenidos con monocapas de DCP y EA, parece lógico postular la existencia en aquellas de una carga positiva. Como en definitiva la magnitud de la mencionada barrera depende de las proporciones relativas PC/PE, de forma similar variará el efecto provocado por la aglutinina sobre las monocapas mixtas.

Las consecuencias de la inclusión de una especie cargada, DCP ó EA, en los modelos ya han sido ampliamente tratadas en la exposición de los datos de monocapas, así como en varias ocasiones a lo largo de esta discusión de resultados. A la luz de las conclusiones que se derivan, es más comprensible ahora el comportamiento obtenido con el sistema de liposomas. Evidentemente, la marcada dependencia que muestra la interacción con respecto a la carga superficial de estos, es esencialmente debida a la barrera electrostática / que es preciso vencer para que se produzca la agregación de los liposomas y posterior fusión de sus membranas; sin embargo, la mayor pendiente de la gráfica en el caso de liposomas cargados positivamente refleja, / sin duda, la dificultad que dicha carga supone para la incorporación de la aglutinina, en forma semejante a lo que ocurre en las monocapas que contienen EA.

El efecto que se deriva de la inclusión de / colesterol en la composición de los modelos, es de gran interés, y cursa de forma semejante en liposomas y en monocapas. En ambos casos, la presencia de colesterol

en proporciones inferiores ó iguales al 37% en liposomas, y al menos del 25% en monocapas, no influye en la capacidad de la aglutinina para provocar la fusión de / aquellos, ó el efecto expansivo sobre las últimas. Sin embargo, cuando la proporción molar fosfolípido/colesterol es de 1:1, es decir, cuando el colesterol representa el 50% (mol/mol) de la composición lipídica del modelo que se trate, la efectividad de la aglutinina disminuye apreciablemente.

Es importante mencionar aquí, que también la capacidad del Ca^{2+} para inducir la fusión de liposomas de PS/Colesterol (1:1), es notablemente inferior a la puesta de manifiesto en ausencia del esteroide (252) . De la misma manera, el importante aumento de la permeabilidad de Na^+ a través de bicapas de PS, promovido por la apoproteína de la principal lipoproteína de la mielina, disminuye cinco veces cuando el colesterol constituye el 50% (mol/mol) de la bicapa, siendo el efecto de su inclusión aún mayor sobre los cambios provocados por otras proteínas (252).

El papel que parecen desempeñar los esteroides en las membranas biológicas, y muy concretamente el colesterol, ha sido estudiado muy extensamente (252, 254). Los datos obtenidos permiten establecer que la principal misión desempeñada por el colesterol es de naturaleza estructural ; concretamente, parece actuar modulando el estado de fluidez de la bicapa lipídica , ejerciendo un cierto papel de amortiguador de cambios bruscos , en un parámetro tan importante para el normal desarrollo / de muchas de las funciones desempeñadas por/ó en la membrana. De esta forma , la presencia de colesterol regula procesos como el transporte pasivo , el transporte / mediado, la actividad de enzimas unidos a la membrana , e incluso la fragilidad osmótica de este orgánulo . La

utilización de modelos de membrana, ha permitido establecer que el colesterol aumenta la rigidez y el grado de orden de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, cuando estos se encuentran en la mesofase de / cristal-líquido. En el estado sólido ó gel de los lípidos, que en la mayor parte de los casos es fisiológicamente irrelevante, el colesterol actúa como fluidificador, probablemente al perturbar la regularidad estructural del sistema.

Se han propuesto distintas relaciones estequiométricas para el complejo formado por la lecitina y el colesterol (254, 255), siendo la que corresponde a una proporción 1:1, la que mayor evidencia experimental ha recibido, por lo que se refiere a dispersiones acuosas (249, 254, 255). Recientemente, Gershfeld (255), ha postulado que el complejo estable lecitina-colesterol en dispersiones acuosas, corresponde a una estequiometría 2:1, independientemente del método y / temperatura usada para la preparación de la dispersión lipídica. Según este autor, sin embargo, cuando la preparación se realiza por sonicación aparece el complejo 1:1, que sería metastable. En monocapas, la mayor parte de los datos experimentales sugieren también la formación del complejo 1:1 (249, 261).

Por tanto, en una mezcla lecitina:colesterol, cuando la proporción de este es inferior al 50% (mol/mol), se tendrá moléculas de lecitina libres y complejos lecitina:colesterol. El sistema en estas condiciones consiste en dos fases inmiscibles con sus correspondientes límites de fase. Algo semejante ocurre cuando la proporción de colesterol excede del 50%, sólo / que, naturalmente, el componente en exceso, que configura una de las fases, es el colesterol. La fase que se halla en menor proporción se encuentra dispersada /

en forma de pequeños " islotes " ó " racimos " en el / seno de la otra (249, 254, 255).

Teniendo en cuenta todo esto, es fácil interpretar lo que ocurre a nuestros modelos de membrana en presencia del extracto. Cuando la proporción de coles-terol es inferior al 50%, la aglutinina puede actuar / sobre la lecitina que no forma parte del complejo, y _ además su acción se ve facilitada por la existencia de los límites de fase, verdaderos defectos de continui-dad en la estructura de la bicapa que facilitan los / procesos de fusión de liposomas y la penetración de la aglutinina en la monocapa. Por el contrario cuando la proporción del esteroi alcanza el 50%, la particular / estabilidad de la bicapa y cohesión entre las moléculas de sus fosfolípidos, dificulta la actuación de la aglu-tinina porque la misma no puede apenas penetrar en su interior.

Efecto sobre la transición de fase de la DPPC

Tanto el resultado obtenido por la técnica / de monocapas, como el logrado en liposomas utilizando el marcador fluorescente ANS, manifiestan muy claramen-te que el efecto provocado por la aglutinina tiende a hacer desaparecer las diferencias entre dos estados / de distinto grado de ordenación: el estado condensado gel y el estado fluido cristal-líquido. Así, con los _ liposomas comprobamos que el rango de temperaturas en el que ambas fases pueden coexistir aumenta, y por me-dio de las monocapas comprobamos, también, que a una temperatura dada, el paso de un estado expandido a / otro condensado se realiza paulatinamente, sin exis-

tencia de una transición de fase. El resultado es de / la mayor importancia porque permite interpretar la causa que provoca la fusión de los liposomas.

Papahadjopoulos y cols (256), en un interesante trabajo en el que estudian la posible relación / entre los efectos provocados por distintas proteínas sobre la transición de fase de fosfolípidos, expansión de sus monocapas, e influencia sobre la permeabilidad de liposomas, encuentran que la apoproteína de la principal lipoproteína de la mielina, aumenta el rango de temperaturas en el que tiene lugar la transición de fase de liposomas de DMPC y DPPC, sin que se llegue a modificar sensiblemente el valor de la temperatura crítica a la que dicha transición se produce, aún cuando / llegue a representar un 50% en peso del sistema. Ellos interpretan los resultados calorimétricos como indicativos de que la apoproteína, aunque embebida en la bicapa — puede penetrar en monocapas de PS provocando / una expansión de hasta un 60% —, no perturba el empaquetamiento de las cadenas acílicas de una forma general, por lo que T_c no varía apenas. Las moléculas de / fosfolípido alrededor de la proteína embebida pueden pueden estar más fuertemente unidas a ella, ó quizás relativamente inmovilizadas por la proteína (257). En consecuencia no participarían en la fusión, de carácter cooperativo, del global de las cadenas. Al disminuir la / unidad cooperativa surge la mayor anchura de la transición. Estos autores calculan en un 6% esta disminución en el caso de liposomas de DPPC, lo que es consistente, dado su reducido valor, con la suposición de que esta proteína no altera sensiblemente el orden a largo al-, cance de la bicapa.

También, es importante reseñar que la apoproteína provoca un aumento de 750 veces en el flujo de /

salida de Na^+ en liposomas de PS. (252)

En un trabajo posterior Papahadjopoulos y cols (258) demuestran que la presencia de la apoproteína induce la progresiva mezcla de moléculas de DMPC y DPPC a partir de dos poblaciones de liposomas constituidas, cada una de ellas por los respectivos fosfolípidos, llegando a la conclusión de que lo que ha tenido lugar es un proceso de fusión de las bicapas, aunque no puede excluirse un mecanismo alternativo envolviendo una simple difusión molecular. En cualquier caso, como señalan Papahadjopoulos y cols (190), es aún muy pronto para generalizar los posibles efectos que distintas proteínas pueden ejercer sobre la fusión de membranas de fosfolípidos. No obstante, y esto es importante, la evidencia experimental existente hoy día, indica que proteínas y oligopéptidos promueven la mezcla molecular entre liposomas, y que este efecto puede estar relacionado con la fusión.

A la vista de todos estos hechos es evidente que se puede trazar un claro paralelismo entre las formas de actuar de la apoproteína hidrofóbica del principal proteolípido de la mielina y la aglutinina de las semillas del *Myrtus communis*: las dos expanden notablemente monocapas de fosfolípidos naturales; las dos provocan un incremento en el rango de temperaturas en el que tiene lugar la transición de fase de la DPPC, pero sin variar apenas el valor de T_c , lo que es reflejo de que en ambos casos no se altera la estructura global / de la lamela. El punto común entre ambas está, sin duda, en su carácter parcialmente hidrofóbico, que les / permite penetrar la bicapa e interaccionar con el reducido número de moléculas de fosfolípidos situadas, a modo de anillo, alrededor de ellas. Finalmente, ambas promueven la fusión de liposomas. Respecto de este he-

cho, hay que recordar, que la Con A, una de las lectinas más estudiadas, también provoca la fusión de liposomas de DPPC, dando lugar a grandes masas de lípidos que mantienen la estructura de multibicapas (160).

Para que dos bicapas se fusionen, es necesario que su interior hidrofóbico, las cadenas de ácidos grasos, se ponga en contacto uno con otro. En una bicapa de fosfolípido puro, en estado fluido, este es / un suceso muy improbable porque la lamela adquiere una conformación que minimiza la exposición de los grupos hidrofóbicos al medio acuoso. Lo mismo se puede decir de una bicapa que se encuentre en estado sólido. / Sin embargo, se ha demostrado que en bicapas de fosfolípido extendidas, ó de radio de curvatura grande, pueden coexistir, dentro del plano de la bicapa, regiones sólidas y fluidas en equilibrio entre sí (259). Estas regiones, son habitualmente pequeñas en número, siendo también pequeño su tiempo de vida. Ello es indicativo de que la energía libre de los correspondientes límites de fase es alta, por lo que es razonable suponer / que en dichos límites pueda tener lugar una exposición parcial de restos hidrofóbicos al medio acuoso. De esta forma, las regiones que se constituyen como límite de fases entre zonas en estado fluido y sólido, pueden actuar como lugares en los que se inicien procesos de fusión.

En el rango de temperaturas en el que tiene lugar la transición de fase de los fosfolípidos, la fase gel, sólida, y la fase de cristal-líquido, fluida, coexisten en equilibrio. Podríamos resumir la sucesión de hechos que tienen lugar de la siguiente manera (259): la fusión de la bicapa, en fase gel, comienza con la / aparición de una serie de huecos y defectos, en lo que llamaríamos por similitud su red cristalina, a tempera

turas por debajo de T_c , la temperatura a la que tiene lugar la fusión global. Se forman así, un cierto número de pequeñas regiones en las que el lípido se encuentra en fase de cristal-líquido, y que actúan de núcleos para el crecimiento de la fase fluida. A medida que la temperatura aumenta, estos núcleos crecen, bien por di fusión molecular ó por algún otro mecanismo, hasta que finalmente la transición se completa.

Como consecuencia de la coexistencia de las dos fases en toda la transición, junto con sus correspondientes límites, en ese rango de temperaturas una / diversidad de procesos muestran un comportamiento particular. Así, la permeabilidad de iones y pequeñas moléculas aumenta anormalmente, tanto en liposomas (244, 251), como en membranas naturales (262, 263); también el transporte de cationes facilitado por el antibiótico valinomicina es superior cerca de T_c (264); y finalmente, la velocidad de fusión de liposomas de / DMPC promovida por el ácido mirístico, (214, 265), así como la motivada por la Con A en los de DPPC(160), es máxima en la transición de fase. En realidad, todas las sustancias que dan lugar a la fusión de liposomas ó incluso de membranas biológicas, influyen sobre la / transición de fase de los fosfolípidos (190).

Todos estos hechos se interpretan en base a la existencia de los mencionados límites de fase, que aparecen así, como auténticas fallas en el plano de la membrana. Las moléculas de fosfolípidos que forman parte de ellos, deben tener conformaciones — afectando a las cadenas y a los grupos polares —, que son distintas, y quizás intermedias, entre las que adoptan en / las regiones sólida y fluida.

La aglutinina del mirto, que puede penetrar la bicapa y formar un complejo con las moléculas de /

fosfolípido, de lo que resulta una inmiscibilidad en el plano de la membrana, podría estabilizar esas conformaciones intermedias facilitando así la fusión de los liposomas.

Consideraciones finales

La aglutinina contenida en las semillas del *Myrtus communis*, debe ser encuadrada dentro del grupo de las que no muestran especificidad serológica ni especificidad química, y que son precisamente las que exhiben un mayor carácter hidrofóbico. Su asociación con la membrana del eritrocito puede tener lugar en dos lugares distintos. De forma específica se puede unir a los restos glucídicos de las glicoproteínas y glicolípidos constituyentes de la membrana celular promoviendo por esta vía el proceso de aglutinación. Por otra parte, puede unirse a este orgánulo, de forma no específica, a través de la bicapa lipídica. Halperin y Shaltiel (260) han demostrado la existencia de áreas hidrófobas en la superficie de eritrocitos, que permiten su discriminación mediante cromatografía de afinidad. Esta unión no específica a la bicapa, sin duda, puede influir en un aspecto esencial de la misma como es su estado de fluidez, con la posible incidencia que ello puede tener sobre el propio fenómeno de la aglutinación.

Schmidt-Ullrich y cols (182), han demostrado la existencia de estos hechos en la unión de la Con A a membranas de timocitos, probando que en condiciones de saturación, del 60 al 75% de la lectina está asociada con lugares distintos de la glicoproteína que

constituye su receptor habitual, y que el nuevo receptor tiene que ser la bicapa lipídica. En este caso, los autores atribuyen a esta última unión los efectos de / aglutinación y toxicidad, mientras que sugieren que la unión a la glicoproteína sería la responsable, a través de un mecanismo transmembrana, de la estimulación mitogénica. El carácter hidrofóbico de la Con A y sus posibles implicaciones biológicas ha comenzado a ser estudiado recientemente (73).

En cualquier caso, parece evidente que, como señala Ochoa (176), es preciso en el futuro plantearse el estudio de la interacción lectina-membrana, con una visión más amplia de la que hasta hoy se ha aplicado, poniendo especial atención en las posibilidades y consecuencias que puede tener su interacción hidrofóbica con la bicapa lipídica. En este sentido, el empleo de los modelos de membrana resulta imprescindible.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- A partir del polvo de semillas de *Myrtus communis* y aplicando un método de extracción sucesiva con disolventes orgánicos, se ha obtenido un producto, cuya actividad específica es doce veces superior a la del extracto bruto, con el que anteriormente se venía trabajando.
- 2.- La propiedad que presenta el extracto de mirto de amortiguar la fluorescencia del Triptófano, y que según nuestros resultados, es atribuible a la aglutinina, puede ser utilizada como método de valoración siempre que las distintas preparaciones sean homogéneas.
- 3.- El extracto, interacciona con bicapas de fosfolípidos puros, con pérdida paralela de la actividad hemaglutinante. Postulamos que la fitohemaglutinina es la sustancia responsable / de dicha interacción. Como consecuencia de ésta, se provoca la fusión de los liposomas. La magnitud del efecto, depende de la concentración de extracto y de liposomas.

4.- Los resultados obtenidos mediante la técnica de capas monomoleculares, nos permiten concluir que existe una penetración de la fitohemaglutinina, tanto en monocapas de fosfolípido puro como mixtas. En el caso de la lecitina el estudio de la región de colapso, nos informa sobre la inmiscibilidad del sistema, que atribuimos a la aparición de una nueva fase constituida por moléculas de fitohemaglutinina y las de fosfolípido que situadas en su entorno próximo están firmemente asociadas a aquellas.

5.- De las propiedades de solubilidad de la aglutinina, de su forma de actuar sobre los modelos de membrana, y de la influencia de los cambios de pH y temperatura sobre la interacción, se deduce, que las fuerzas que gobiernan ésta última, son esencialmente de naturaleza hidrofóbica.

6.- La magnitud del efecto provocado por la aglutinina sobre el modelo de liposomas, no se ve significativamente alterada por la presencia de Ca^{2+} , Mg^{2+} ó Mn^{2+} en el medio.

Asimismo, ninguno de los azúcares monoméricos que habitualmente inhiben la acción de las lectinas, afecta, en nuestro caso, a la magnitud de la interacción con los liposomas.

- 7.- Cuando el colesterol forma parte de la composición, tanto de liposomas como de monocapas, en proporciones inferiores al 50% (mol/mol) su presencia no ejerce efecto sobre la acción de la aglutinina. Por el contrario, para la relación PC : Colesterol 1:1, la fusión de los liposomas, y la penetración de la monocapa se ven / considerablemente reducidas, como consecuencia _ del efecto condensante provocado por el esterol.
- 8.- Los resultados obtenidos con monocapas puras de DCP y EA, y con mixtas de PC : DCP y / PC : EA, pueden ser explicados admitiendo la existencia de una carga positiva en la molécula de _ aglutinina.
- 9.- La transición de fase de la DPPC, en / ambos modelos, se ve difuminada por la incorporación de la fitohemaglutinina, sin que se modifi- que la temperatura crítica a la que tiene lugar. El efecto, consiste fundamentalmente, en la fluídificación de la fase " gel ".
- 10.- El conjunto de nuestros resultados nos permite deducir, que la molécula de aglutinina , de pequeño tamaño, que muestra evidentes caracte- rísticas anfifílicas, y que posiblemente posea / en su parte polar un grupo ionizable, es capaz _ de penetrar la bicapa lipídica, asociándose intímamente con un reducido número de moléculas de /

fosfolípido, alterando con ello el estado físico de sus cadenas hidrocarbonadas, e induciendo / así, separaciones laterales de fase, que, en el caso de los liposomas, conducen a la aparición de " fallas " ó defectos estructurales, en virtud de los cuales se promueve su fusión.

- 11.- En definitiva, mediante el empleo de modelos de membrana, la hipótesis inicial sobre la que hemos basado nuestro trabajo, ha recibido plena confirmación. La fitohemaglutinina del *Myrtus communis* interacciona con la bicapa lipídica con decisivas consecuencias sobre su estado estructural.

Se abre así una importante vía para / el estudio, en futuros trabajos, de las implicaciones que este hecho posea, sobre el fenómeno de la eritro - aglutinación inducida por esta / sustancia.

Sin embargo, para que tales estudios puedan ser interpretados en forma adecuada a nivel molecular, es absolutamente necesario plantearse el aislamiento y caracterización de la / fitohemaglutinina contenida en las semillas del *Myrtus communis*.

282

B I B L I O G R A F I A

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Nowell, P., Cancer Res., 20, 462, 1.960.
- 2.- Robbins, G.H., Science, 146, 1.648, 1.964.
- 3.- Naspitz, Ch. K., y M. Richter, Progr. Allergy, 12, 1, 1.968.
- 4.- Ling, N.R., Lymphocyte Stimulation, North-Holland, Amsterdam, 1.968.
- 5.- Burger, M.M., y K.D. Noonan, Nature, 228, 512, / 1.970.
- 6.- Shier, W.T., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68, 2078, 1.971.
- 7.- Sumner, J.B., y S.F. Howell, J. Bacteriol., 32, 227, 1.936.
- 8.- Liener, I.E., y M.J. Pallansch, J. Biol. Chem., / 197, 29, 1.952.
- 9.- Allen, H.J., y E.A.Z. Johnson, Carbohydrate Research, 58, 253, 1.977.
- 10.- Blacik, L.J., M. Breen, H.G. Weinstein, R.A. Sittig, y M. Cole, Biophys. Biochem. Acta, 538, 225, 1.978.
- 11.- Bowles, D.J., y H. Kauss, Febs Lett., 66, 1, 16, 1.976.
- 12.- Krajhanzl, A., V. Horejsi, y J. Kocourek, Biophys. Biochem. Acta, 532, 209, 1.978.

- 13.- Burger, M.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 994, 1.969.
- 14.- Levine, D., M.J. Kaplan y P.J. Jreenaway, Biochem. J., 129, 847, 1.972.
- 15.- Lotan, R., A.E.S. Gussin, H. Lis, y N. Sharon, Biochem. Biophys. Res. Commun., 52, 656, 1.973.
- 16.- Shaper, J.H., R. Barker, y R.L. Hill, Anal. Biochem., 53, 564, 1.973.
- 17.- Bloch, R., y M.M. Burger, Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 13, 1.974.
- 18.- Kabat, E.A., y M.M. Mayer, " Experimental Immunology chemistry ", 114-115. Springfield III. Thomas / 2^a Ed.
- 19.- Liener, I.E., Arch. Biochem. Biophys., 54, 223, 1.955.
- 20.- Lis, H., y N. Sharon, Methods Enzimol., 28, 360, 1.972.
- 21.- Agrawal, B.B.L., y I.J. Goldstein, Biochem. Biophys. Acta., 133, 376, 1.967.
- 22.- Olson, M.O.J., y I.E. Licner, Biochemistry, 6, / 105, 1.967.
- 23.- Tichá, M., G. Entlicher, J.V. Kostir, J. Kocourek, Biochem. Biophys. Acta., 221, 282, 1.970.
- 24.- Howard, I.K., H.J. Sage, M.D. Stein, N.M. Young, M.A. Leon, D.F. Dyckes, J. Biol. Chem., 246, 1.590, 1.971.
- 25.- Entlicher, G., J.V. Kostir, J. Kocourek, Biochem. Biophys. Acta., 221, 272, 1.970.
- 26.- Etzler, M.E., y E.A. Kabat, Biochemistry, 9, /

869, 1.970.

- 27.- Hammarström, S., y A. Kabat, Biochemistry, 8, 2696, 1.969.
- 28.- Agrawal, B.B.L., I.J. Joldstein, Arch. Biochem. Biophys., 124, 218, 1.968.
- 29.- Entlicher, G., J.V. Kostir, y J. Kocourek, Biochem. Biophys. Acta., 236, 795, 1.971.
- 30.- Allen, A.K., A. Neuberger, y N. Sharon, Biochem. J., 31, 155, 1.973.
- 31.- Lis, H., C. Friedman, N. Sharon, y E. Katchalski, Arch. Biochem. Biophys., 117, 301, 1.966.
- 32.- Gould, N.R., y S.L. Scheinberg, Arch. Biochem. Biophys., 137, 1, 1.970.
- 33.- Galbraith, W., I.J. Goldstein, Febs Lett., 9, 197, 1.970.
- 34.- Yariv, J., A.J. Kalb, y A. Levitzki, Biochem. Biophys. Acta., 165, 303, 1.968.
- 35.- Paulova, M., M. Tichá, G. Entlicher, J.V. Kostir, y J. Kocourek, Biochem. Biophys. Acta., 252, 388, 1.971.
- 36.- Takahashi, T., Y. Shimabayashi, K. Iwamoto, K. Izu tsu, y I.E. Liener, Agr. Biol. Chem., 35, 1274, 1.971.
- 37.- Burger, M.M., y A.R. Goldberg, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 359, 1.967.
- 38.- Burger, M.M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62, 994, 1.969.
- 39.- Gould, N.R., y S.L. Scheinberg, Arch. Biochem. Biophys., 141, 607, 1.970.

- 40.- Kalb, A.J., y A. Lusting, Biochem. Biophys. Acta, 168, 366, 1968.
- 41.- McKenzie, G.H., W.H. Sawyer, y L.W. Nichol, Biochem.- Biophys. Acta, 263, 283, 1977.
- 42.- Sumner, J.B., N. Gralén, I.B. Eriksson-Quensel, J. / Biol. Chem., 125, 45, 1938.
- 43.- Inbar, M., J.G. Collard, A. de Wildt, E.P.M. Oomen- / Meulemans, J. Smeekeens, y P. Emmelot, Febs Lett., 77, 2, 173, 1977.
- 44.- Inbar, M., Federation European Biochem. Soc. Lett., 67, 180, 1976.
- 45.- Inbar, M., y H. Ben- Bassat, Intern. J. Cancer, 18, - 293, 1976.
- 46.- Inbar, M., y M. Shinitzky, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 2128, 1974.
- 47.- Inbar, M., y M. Shinitzky, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 4229, 1974.
- 48.- Inbar, M., M. Shinitzky, y L. Sachs, Federation European Biochem. Soc. Lett., 38, 268, 1974.
- 49.- Shinitzky, M., y M. Inbar, J. Mol. Biol., 85, 603, 1974.
- 50.- Shinitzky, M., y M. Inbar, Biochem. Biophys. Acta, - 433, 133, 1976.
- 51.- Bretscher, M.S., Nature New Biol., 231, 229, 1971.
- 52.- Tomita, M., y V.T. Marchesi, Proc. Nat. Acad. Sci. / USA, 72, 2964, 1975.
- 53.- Hunt, R.C., y J.C. Brown, J. Mol. Biol., 97, 413, 1975.
- 54.- McConnell, H.M., "Functional Linkage in Biomolecular Systems", F.O. Schmidt, D.M. Schneider, D.M. Crothers Eds (Raven, New York), 1975.

- 55.- Yahara, I., y G.M. Edelman, Proc. Nat. Acad. Sci. /
USA, 69, 608, 1972.
- 56.- Yahara, I., y G.M. Edelman, Proc. Nat. Acad. Sci. /
USA, 72, 1579, 1975.
- 57.- Gunther, G.R., J.L. Wang, I. Yahara, B.A. Cunningham,
G.M. G.M. Edelman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 1012, -
1973.
- 58.- Edelman, G.M., I. Yahara, J.L. Wang, Proc. Nat. Acad.
Sci. USA, 70, 1442, 1973.
- 59.- Albertini, D.F., y J.I. Clark, Proc. Nat. Acad. Sci.
USA, 72, 4976, 1975.
- 60.- Schlessinger, J., E.L. Elson, W.W. Webb, I. Yahara, U.
Rutishauser, y G.M. Edelman, Proc. Nat. Acad. Sci.-
USA, 74, 1110, 1977.
- 61.- Ortega, M., y A. Dolara, Anales Inst. Bot. A.Y. Ca-
vanilles, 237, 1966.
- 62.- Abeger, A., Tesis Doctoral, Fac. Farmacia Madrid-Com-
plutense. Marzo 1974.
- 63.- Ortega, M., y R. Otero, Unifarma V, 224, 1975.
- 64.- Andrés, P., Tesina, Fac. Farmacia Madrid-Complutense
Julio 1977.
- 65.- Gago, F., Tesina, Fac. Farmacia Madrid-Complutense./
Noviembre 1979.
- 66.- Ortega, M., y A. Abeger, Ciencia & Industria Farmaceu-
tica, 8, 103, 1976.
- 67.- Ródenas, S., Tesis Doctoral, Fac. Farmacia Madrid- /
Complutense. Junio 1978.
- 68.- Abeger, A., Escuela de Bromatología, Tesina, Fac. Far-
macia Madrid- Complutense. Mayo 1979.

- 69.- Ortega, M., y S. Ródenas, *Clinica Chimica Acta*, 92, /
135, 1979.
- 70.- Ochoa, J.L., y T. Kristiansen, *Febs Lett.*, 90, 145, /
1978.
- 71.- Boldt, D.H., S.F. Speckart, R.L. Richards, y C.R. Al
ving, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74, 208, 1977.
- 72.- Reeke, G.N., J.W. Becker, B.A. Cunningham, G.R. Gunt
her, J.L. Wang, y G.M. Edelman, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
234, 369, 1974.
- 73.- Ochoa, J.L., T. Kristiansen, y S. Pählman, *Biochem./*
Biophys. Acta, 577, 102, 1979.
- 74.- Vlodavsky, I., y L. Sachs, *Exp. Cell. Res.*, 93, 111, -
1975.
- 75.- Shipley, G.G., "Biological Membranes", pp. 1-89, --/
Academic Press, London y N. York.
- 76.- Hubell, W.L., y H.M. McConnell, *Proc. Nat. Acad. --*
Sci. USA, 64, 20, 1969.
- 77.- Steim, J.M., M.E. Tourtellotte, J.C. Reinert, R.N. /
McElhaney, y R.L. Rader, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*
63, 104, 1969.
- 78.- Davies, J.T., y E.K. Rideal, "Interfacial Phenomena",
pp. 217-281, Academic Press, London y N. York. 1963.
- 79.- Gaines, G.L., "Insoluble Monolayers at Liquid-Gas
Interfaces", pp. 136-207, Interscience, N. York. 1966.
- 80.- Gulik-Krzywicki, T., E. Shechter, V. Luzzati, y M. -/
Faure, *Nature*, 223, 1116, 1969.
- 81.- Parsegian, V.A., *Science*, 156, 939, 1967.
- 82.- Shah, D.O., y J.H. Schulman, *J. Lipid Res.*, 8, 227, -/
1967.

- 83.- Seelig, J., J. Amer. Chem. Soc., 92, 3881, 1970.
- 84.- Salsbury, N.J., D. Chapman, y G. Parry-Jones, Trans. Faraday Soc., 66, 1554, 1970.
- 85.- Levine, Y.K., A.I. Bailey, y M.F.H. Wilkins, Nature, 220, 577, 1968.
- 86.- Chapman, D., R.M. Williams, y B.D. Ladbroke, Chem. / Phys. Lipids, 1, 445, 1967.
- 87.- Ladbroke, B.D., y D. Chapman, Chem. Phys. Lipids, 3, 304, 1969.
- 88.- Gleary, G.W., y J.L. Zatz, J. Pharm. Sci., 66, 975, - / 1977.
- 89.- Demel, R.A., L.L.M. van Deenen, y B.A. Pethica, Biochem. Biophys. Acta, 135, 11, 1967.
- 90.- Cadenhead, D.A., R.J. Demchak, y M.C. Phillips, Koll. Z.Z. Polym., 22, 59, 1967.
- 91.- Demel, R.A., W.S.M. Geurts van Kessel, y L.L.M. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 226, 26, 1972.
- 92.- Tinoco, J., y D.J. McIntosh, Chem. Phys. Lipids, 4, / 72, 1970.
- 93.- Gier, J. de, J.G. Mandersloot, y L.L.M. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 173, 143, 1969.
- 94.- Demel, R.A., K.R. Bruckdorfer, y L.L.M. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 255, 321, 1972.
- 95.- Romeo, D., A. Henckley, y L. Rothfield, J. Mol. Biol. 53, 475, 1970.
- 96.- Buckelew, A.R., y G. Colacicco, Biochem. Biophys. / Acta, 233, 7, 1971.
- 97.- Dennis, V.W., N.W. Stead, y T.E. Andreoli, J. Gen. / Physiol. 55, 375, 1970.

- 98.- Bangham, A.D., J. de Gier, y G.D. Greville, Chem. Phys. Lipids, 1, 225, 1.967
- 99.- Luzzati, V., R. Reiss-Husson, E. Rivas, y T. Gulik-Krzywicki, Ann. N.Y. Acad. Sci., 137, 409, 1.966
- 100.- Papahadjopoulos, D., y N. Miller, Biochem. Biophys. Acta, 135, 624, 1.967
- 101.- Gier, J. de, J.G. Mandersloot, y L.L.M. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 150, 666, 1.968
- 102.- Gregoriadis, G., Febs Lett., 36, 292, 1.973
- 103.- Hauser, H., M.C. Phillips, y M. Stubbs, Nature, 239, 342, 1.972
- 104.- Bangham, A.D., Hosp. Pract., 8, 78, 1.973
- 105.- Bangham, A.D. Prog. Biophys. Mol. Biol., 18, 29, 1.968
- 106.- Bangham, A.D., M.M. Standish, y J.C. Watkins, J. Mol. Biol., 13, 238, 1.965
- 107.- Bangham, A.D., M.M. Standish, y G. Weissmann, J. Mol. Biol., 13, 253, 1.965
- 108.- Papahadjopoulos, D., y J.C. Watkins, Biochem. Biophys. Acta, 135, 639, 1.967
- 109.- Le Neveu, D.M., R.P. Rand, y V.A. Parsegian, Nature, 259, 601, 1.976
- 110.- Kimelberg, H.K. y D. Papahadjopoulos, Biochem. / Biophys. Acta, 233, 805, 1.971
- 111.- Kimelberg, H.K., y D. Papahadjopoulos, J. Biol. Chem., 246, 1142, 1.971
- 112.- Kinsky, S.C., Ann. Rev. Pharmacol., 10, 119, 1.970

- 113.- Hillier, A.P., J. Physiol., 211, 585, 1.970
- 114.- Kinsky, S.C., Biochem. Biophys. Acta, 265, 1, 1972
- 115.- Papahadjopoulos, D., Biochem. Biophys. Acta, 265, 169, 1.972
- 116.- Cohen, E., Bangham, A.D., Nature, 236, 173, 1.972
- 117.- Fosger, M.C., y J. Yguerabide, J. Membr. Biol., 45, 125, 1.979
- 118.- Lentz, B.R., Y. Barenholz, y T.E. Thompson, Biochemistry, 15, 4521, 1.976
- 119.- Reeves, J.P., y R.M. Dowben, J. Membr. Biol., 3, 123, 1.970
- 120.- Bangham, A.D., y R.W. Horne, J. Mol. Biol., 8, / 660, 1.964
- 121.- Johnson, A.R.; y J.B. Davenport, " Biochemistry ant Methodology of Litids ", Wiley N. York.
- 122.- Huang, C., Biochemistry, 8, 344, 1.969
- 123.- Finer, E.G., A.G. Flook, y H. Hauser, Biochem. Biophys. Acta, 260, 49, 1.972
- 124.- Huang, C., y J.P. Charlton, Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 1660, 1.972
- 125.- Johnson, S.M., A.D. Bangham, M.W. Hill, y E.D. Korn, Biochem. Biophys. Acta, 233, 820, 1.971
- 126.- Bangham, A.D., M.W. Hill, y N.G.A. Miller, " Methods in Membrane Biology ", vol. 1, E.D. Korn, Ed. Plenum Press, N.Y., 1.974
- 127.- Wilkins, M.H.F., A.E. Blaurock, y D.M. Engelman, Nature New Biol., 230, 72, 1.971
- 128.- Johnson, S.M., y N. Buttrass, Biochem. Biophys .

- Acta, 307, 20, 1.972
- 129.- Seufert, W.D., Biophysik, 7, 60, 1.970
- 130.- Tinker, D.O., Chem. Phys. Lipids, 8, 230, 1.972
- 131.- Huang, C., y L.P. Lee, J. Amer. Chem. Soc., 95, 234, 1.973
- 132.- Ulmius, J., H. Wennerström, G. Lindblom, y G. Arwidson, Biochem. Biophys. Acta, 389, 197, 1.975
- 133.- Oldfield, E., D. Chapman, Febs Lett., 21, 302, 1.972
- 134.- Semer, R., y E. Gelerinter, Chem. Phys. Lipids, 23, 201, 1.979
- 135.- Ladbroke, B.D., R.M. Williams, y D. Chapman, Biochem. Biophys. Acta, 158, 333, 1.968
- 136.- Kruyff, B. de, P.W.M. van Dijck, R.A. Demel, A. Schuijff, F. Brants, y L.L.M. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 356, 1, 1.974
- 137.- Cogan, U., M. Shinitzky, G. Weber, y T. Nishida, Biochemistry, 12, 521, 1.973
- 138.- Hsia, J.C., H. Schneider, y I. C.P. Smith, Chem. Phys. Lipids, 4, 238, 1.970
- 139.- Chapman, D., y S.A. Penkett, Nature, 211, 1304, 1.966
- 140.- Gier, J. de, J.G. Mandersloot, J.V. Hupkes, R.N. McElhaney, y W.P. van Beek, Biochem. Biophys. Acta, 233, 610, 1.971
- 141.- Nicolls, P., y N. Miller, Biochem. Biophys. Acta, 356, 184, 1.974
- 142.- Johnson, S.M., y A.D. Bangham, Biochem. Biophys. Acta, 193, 82, 1.969

- 143.- Colley, C.M., S.M. Metcalfe, B. Turner, A.S.V. _
Burgen, y J.C. Metcalc, Biochem. Biophys. Acta ,
233, 720, 1.971
- 144.- Weissmann, G., E.A. Rita, Nature New Biol., 240,
167, 1.972
- 145.- Guerrieri, F., y B.D. Nelson, Febs Lett., 54,339,
1.975
- 146.- Katzenstein, I.P., A.M. Spielvogel, y A.W. Nor-
man, J. Antibiot., 27, 943, 1.974
- 147.- Tillack, T.W., y S.C. Kinsky, Biochem. Biophys .
Acta, 323, 43, 1.973
- 148.- Read, B.D., R.A. Demel, H. Wiegandt y L.L.M. van
Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 470, 325, 1.977
- 149.- Deleers, M., A. Poss, y J.M. Ruysschaert, Biochem.
Biophys. Res. Commun., 72, 709, 1.976
- 150.- Rendi, R., C.A. Kuattner, y J.A. Gordon, Biochem.
Biophys. Res. Commun., 72, 1071, 1.976
- 151.- Curatolo, W., G.G. Shipley, D.M. Small, B. Sears,
y L.J. Neuringer, J. Amer. Chem. Soc., 99, 20, _
6771, 1.977
- 152.- Surofia, A., B.K. Bachhawat, y S.K. Podder, Natu
re, 257, 802, 1.975
- 153.- Maget-Dana, R., A.C. Roche, y M. Monsigny, Febs _
Lett., 79, 305, 1.977
- 154.- Curatolo, W., A.O. Yau, D.M. Small, y B. Sears ,
Biochemistry, 17, 5740, 1.978
- 155.- Orr, G.A., R.R. Ranbo, y F.W. Bangerter, J. Biol.
Chem., 254, 4721, 1.979
- 156.- Redwood, W.R., V.K. Jansons, y B.C. Patel, Bio-,

- chem. Biophys. Acta, 406, 347, 1.975
- 157.- Redwood, W.R., y T.G. Polefka, Biochem. Biophys. Acta, 455, 631, 1.976
- 158.- Rendi, R., A.E. Vatter, y J.A. Gordon, Biochem. Biophys. Acta, 550, 318, 1.979
- 159.- Gad, A.E., R. Bróza, y G. D. Eytan, Biochem. Biophys. Acta, 556, 181, 1.979
- 160.- Bosch, J. van der, y H.M. McConnell, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 4409, 1.975
- 161.- Folch, J.M., Lees, y G.H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., 226, 497, 1.957
- 162.- Rouser, G., G. Kritchewsky, A. Yamamoto, G. Simon, G. Galli, y A.J. Bauman, Meth. Enzymol., 14, 272, 1.969
- 163.- Dittmer, J., y R.E. Lester, J. Lipid Res., 5, 126, 1.964
- 164.- Faucon, J.F., y C. Lussan, Comptes Rendus, C-277, 14, 591, 1.973
- 165.- Bartlett, G.R., J. Biol. Chem., 234, 466, 1.959
- 166.- Huang, T.C., C.P. Chen, V. Wfler, y A. Raftery, Analit. Chem, 30, 10, 1405, 1.961
- 167.- Hauser, H.O., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 1049, 1.971
- 168.- Hauser, H.O., y L. Irons, Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem., 353, 1579, 1.972
- 169.- Saha, J., D. Papahadjopoulos, y C.E. Wenner, Biochem. Biophys. Acta, 196, 10, 1.970
- 170.- Chaparro, P., Tesina, Fac. Fcia Univ Complutense. Madrid, Junio 1.979

- 171.- Klein, R.A., Biochem. Biophys. Acta, 210, 486, 1.970
- 172.- Glauert, A.M., y J.A. Lucy, J. Microscopy, 89, 1, 1.969
- 173.- Schullery, S.E., y J.P. Garzaniti, Chem. Phys. Lipids, 12, 75, 1.973
- 174.- Jacobson, K., y D. Papahadjopoulos, Biophys. J., 16, 549, 1.976
- 175.- Alda, E., Tesina. Fac. C. Químicas. Univ. Autónoma Madrid. Octubre 1.979
- 176.- Ochoa, J.L., Pathol. Biol., 27, 103, 1.979
- 177.- Avrameas, S., y B. Guilbert, Biochimie, 53, 603, 1.971
- 178.- Thomasson, D.L., y R.J. Doyle, Biochem. Biophys. Res. Commun., 67, 1545, 1.975
- 179.- Elving, Markowitz, y Rosenthal, Analyt. Chem., 28, 1179, 1.956
- 180.- Schnebli, H.P., y T. Bachi, Exp. Cell. Res., 91, 175, 1.975
- 181.- Doty, P., y J.T. Edsall, Adv. Prot. Chem. VI, / Academic Press, N. York. 1.951
- 182.- Schmidt-Ulrich, R., D.F.H. Wallach, y J. Hendricks, Biochem. Biophys. Acta, 443, 587, 1.976
- 183.- Reisner, Y., H. Lis, y N. Sharon, Exp. Cell. Res., 97, 445, 1.976
- 184.- Kalb, A.J., y A. Levitzki, Biochem. J., 109, 669, 1.968
- 185.- Doyle, R.J., D.L. Thomasson, R.F. Gray, y R.H. Glew, Febs Lett., 52, 185, 1.975

- 186.- Mc Cubbin, W.D., K. Olkawa, y C.M. Kay, Biochem. Biophys. Res. Commun., 43, 666, 1.971
- 187.- Richardson, C.E., y W.D. Behnke, J. Mol. Biol., 102, 441, 1.976
- 188.- Doyle, R.J., D.L. Thomasson y S.K. Nicholson, / Carbohydrate Res., 46, 111, 1.976
- 189.- Lansman, J. y D.H. Haynes, Biochem. Biophys. Acta. 394, 335, 1.975
- 190.- Papahadjopoulos, D., G. Poste, y W.J. Vail, Methods in Membrane Biology, 10 (1.979). Editor E.D. Korn. Ed. Plenum, Press. N.Y.
- 191.- Papahadjopoulos, D., G. Poste, Beschaeffer, y / Wjvail, Biochem. Biophys. Acta, 352, 10, 1.974
- 192.- Weissmann, G., Gsessa, y S. Weissmann, Biochem. Pharmacol., 15, 1537, 1.966
- 193.- Ynone, K., y T. Kitagawa, Biochem. Biophys. Acta, 426, 1, 1.976
- 194.- Hertz, R., y Y. Barenholz, J. Coll. Interf. Sci., 60, 188, 1.977
- 195.- Ribeiro, A.A., y E.A. Dennis, Biochem. Biophys. Acta, 332, 26, 1.973
- 196.- Richards, M.H., y C.R. Gardmer, Biochem. Biophys. Acta, 543, 508, 1.978
- 197.- Pflumm, M.N., J.L. Wang, y G.M. Edelman, J., Biol. Chem., 246, 4369, 1.971
- 198.- Grimaldi, J.J., y B.D. Sykes, J. Biol. Chem., 250, 1618, 1.975
- 199.- Ben-Bassat, A. Polliak, S.M. Rosenbaum, E. Napars tek, D. Shouval y M. Inbar, Cancer Res., 37, 1307, 1.977

- 200.- Gent, M.P.N., y J.H. Prestegard, Biochemistry, _
13, 4027, 1.974
- 201.- Newman, G.C., y C. Huang, Biochemistry, 14,3363,
1.975
- 202.- Kruyff, B. de, P.R. Cullis, y G.K. Radda, Bio- _
chem. Biophys. Acta, 436, 729, 1.976
- 203.- Johnson, S.M., Biochem. Biophys. Acta, 307, 27, _
1.973
- 204.- Pollack, W., y R.P. Rackel, Int. Arch. Allergy _
Appl. Immunol., 54, 29, 1.977
- 205.- Sachtleben, P., R. Gsell, y J.N. Mehrishi, Vox _
Sang., 25, 519, 1.973
- 206.- Yi, P.N., y R.C. McDonald, Chem. Phys. Lipids, _
11, 114, 1.973
- 207.- Chong, C.S., y K. Colbow, Biochem. Biophys. Acta,
436, 260, 1.976
- 208.- Marsh, D., A. Watts, y P.F. Knowles, Biochem. /
Biophys. Acta, 465, 500, 1.977
- 209.- Chan, S.I., M.P. Sheetz, C.H.A. Seiter, G.W. Fei-
genson, M. Hsu, A. Lau, y Y. Yan, Ann. N.Y. Acad.
Sci., 222, 499, 1.975
- 210.- Melchior, P.L., y H.J. Morowitz, Biochemistry, _
11, 4558, 1.972
- 211.- Marsh, D., A. Watts, A.D. Phillips, y P.F. Kno-
wles, Biochem. Biophys. Res. Commun., 49, 641, _
1.972
- 212.- Abramson, M.B., Biochem. Biophys. Acta, 225, 167,
1.971
- 213.- Sheetz, M.P., y S.I. Chan, Biochemistry, 11, /

- 4573, 1.972
- 214.- Kantor, H.L., y J.H. Prestegard, Biochemistry, 14, 1790, 1.975
- 215.- Yguerabide, J., y M.C. Foster, J. Memb. Biol., 45, 109, 1.979
- 216.- Overath, P., y H. Trauble, Biochemistry, 12, 2625, 1.973
- 217.- A. Ben-Naim, " Hydrophobic Interactions ". Plenum Press N.Y.- London. 1.980
- 218.- Stark, G., R. Benz, G.W. Pohl, y K. Janko, Biochem. Biophys. Acta, 266, 603, 1.972
- 219.- Chapman, D., N.F. Owens, y D.A. Walcker, Biochem. Biophys. Acta, 120, 148, 1.966
- 220.- Trauble, H., y D.H. Haynes, Chem. Phys. Lipids, 7, 324, 1.971
- 221.- Lee, A.G., N.J.M. Birdsall, Y.K. Levine, J.C. Metcalfe, Biochem. Biophys. Acta, 255, 43, 1.972
- 222.- Phillips, M.S., R.M. Williams, y D. Chapman, Chem. Phys. Lipids, 3, 234, 1.969
- 223.- Trauble, H., Naturwissenschaften, 58, 277, 1.971
- 224.- Devaux, P., y H.M. McConnell, J. Amer. Chem. Soc. 94, 4475, 1.972
- 225.- Wilkins, G., S.P. Rose, y C.F. Fox, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 617, 1.970
- 226.- Abramson, M.B., y D. Pisetsky, Biochem. Biophys. Acta, 282, 80, 1.972
- 227.- Engelman, D.M., J. Mol. Biol., 58, 153, 1.971
- 228.- Reinert, J.C., y J.M. Stein, Science, 168, 1580, 1.970

- 229.- Luzzati, V., " Biological Membranes ", Ed. D. / Chapman, Academic Press N.York, 1.968
- 230.- Lippert, J.L., y W.L. Peticolas, Biochem. Biophys. Acta, 282, 8, 1.972
- 231.- Barker, R.W., J.D. Bell, G.K. Radda, y R.E. Richards, Biochem. Biophys. Acta, 260, 161, 1.972
- 232.- Hubbell, W.L., y H.M. McConnell, J. Amer. Chem. Soc., 93, 314, 1.971
- 233.- Lentz, B.R., Y. Barenholz, y T.E. Thompson, Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol., 34, 633, 1.975
- 234.- Turner, D.C., y L. Brand, Biochemistry, 7, 3381, 1.968
- 235.- Haynes, D.H., J. Memb. Biol., 17, 341, 1.974
- 236.- Azzi, A., P. Gherardini, y M. Santato, J. Biol. Chem., 246, 2035, 1.971
- 237.- Trauble, H., Biomembranes, 3, 197, 1.972
- 238.- Haynes, D.H., y H. Staerk, J. Memb. Biol., 17, 313, 1.974
- 239.- Trauble, H., y P. Overath, Biochem. Biophys. Acta, 307, 491, 1.973
- 240.- Kosower, E.M., J. Amer. Chem. Soc., 80, 3253, 1958
- 241.- Kosower, E.M., J. Amer. Chem. Soc., 80, 3261, 1958
- 242.- Zingsheim, H., y D.A. Haydon, Biochem. Biophys. Acta, 298, 755, 1.973
- 243.- Tsong, T.Y., Biochemistry, 14, 5409, 1.975
- 244.- Tsong, T.Y., Biochemistry, 14, 5415, 1.975
- 246.- Op Den Kamp, J.A., J. de Gier, y L.L.M. van Deenen, Biochem. Biophys. Acta, 345, 253, 1.974

- 247.- Hinz, H.J., y J.M. Sturtevant, J. Biol. Chem., 247, 6071, 1.972
- 248.- Stryer, L., J. Mol. Biol., 13, 482, 1.965
- 249.- Phyllips, M.C., " Progress in Surface and Membrane Science ", pp. 139-221, vol. 5. Academic Press 1.972
- 250.- Shah, O.D., y M.J.H. Schulman, " Molecular Association in Biological and Related Systems ". E.D. Goddard, Symposium Chairman. American Chemical Society. Washington D.C., 1.968
- 251.- Papahadjopoulos, D., K. Jacobson, S. Nir, y T. Isac, Biochem. Biophys. Acta, 311, 330, 1.973
- 252.- Papahadjopoulos, D., M. Cowden, y H. Kimelberg, Biochem. Biophys. Acta, 330, 8, 1.973
- 253.- Lee, A.G., Nature, 262, 545, 1.976
- 254.- Demel, R.A., y B. de Kruffyff, Biochem. Biophys. Acta, 457, 109, 1.976
- 255.- Gershfeld, N.L., Biophys. J., 12, 469, 1.978
- 256.- Papahadjopoulos, D., M. Moscarello, E.H. Eylar, y P. Isac, Biochem. Biophys. Acta, 401, 317, 1.975
- 257.- Jost, P., O.H. Griffith, R.A. Capaldi, y G. Vanderkool, Biochem. Biophys. Acta, 311, 141, 1.973
- 258.- Papahadjopoulos, D., S. Hui, W.J. Vail, y G. Poste, Biochem. Biophys. Acta, 448, 245, 1.976
- 259.- Lee, A.G., Biochem. Biophys. Acta, 472, 237, 1.977
- 260.- Halperin, G., y S. Shatziel, Biochem. Biophys. Res. Commun., 72, 1497, 1.976
- 261.- Kruffyff, B. de, R.A. Demel, A.J. Soltboom, L.L.M. van Deenen, y A.F. Rosenthal, Biochem. Biophys.

Acta, 307, 1, 1.973

- 262.- Linden, C.D., K.L. Wright, M.H. McConnell, y C.
F. Fox, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 2271, 1973
- 263.- Linden, C.D., y C.F. Fox, J. Supramol. Struct.,
1, 535, 1.973
- 264.- Wu, S.H.-W., y H.M. McConnell, Biochem. Biophys.
Res. Commun., 55, 484, 1.973
- 265.- Prestegard, J.H., y B. Fellmeth, Biochemistry, 13,
1122, 1.974

